

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LOUISE PROVIN

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES REOLÓGICAS
DE PECTINAS DA CASCA DE *Caryocar brasiliense* Cambess (Pequi)**

CURITIBA

2012

LOUISE PROVIN

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES REOLÓGICAS
DE PECTINAS DA CASCA DE *Caryocar brasiliense* Cambess.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá
Co-orientadoras: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Duarte Nosedá; Prof^a Dr^a. Joana Léa Meira Silveira

CURITIBA

2012

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá

Aos meus pais, Arlete e Willian, por terem escolhido o caminho mais difícil.

À minha avó Lourdes, segunda mãe.

À Lorena, irmã e melhor amiga.

Ao “Salvador”, família que eu escolhi.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Arlete e Willian, e à minha amada irmã Lorena, pelo incentivo, apoio, amor e compreensão, sempre;

Ao “Salvador”, com quem aprendi o verdadeiro significado do amor, por estar sempre ao meu lado, na alegria e na tristeza;

Ao programa de pós-graduação em Ciências - bioquímica, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal;

Ao meu orientador, profº Miguel Nosedá, pela oportunidade e colaboração;

Às co-orientadoras da minha pesquisa, prof^{as} Maria Eugênia Duarte Nosedá e Joana Léa Meira Silveira, pelo apoio nesta etapa;

Ao profº Sérgio Ascencio por me enviar as amostras;

À todos os meus companheiros de trabalho e amigos do departamento, por tornarem tudo MUITO mais divertido. Especialmente à Rhayla não apenas pela amizade, mas por me auxiliar no trabalho de reologia; à Tatiane, Jenifer e ao Luciano por sanarem minhas inúmeras dúvidas e por toda a harmonia e amizade no laboratório e à Patrícia Peres, pelas visitas sempre bem vindas à minha bancada e por toda a parceria nos momentos mais complicados.

À professora Lys Mary Cândido, pelo incentivo desde a Iniciação científica;

À todos os colegas do departamento, pelo apoio técnico e colaboração;

À todos os funcionários e técnicos, pela cooperação e realização das análises;

Ao apoio financeiro do CNPq, CAPES e REUNI.

Muito obrigada!

“Sigo em frente, nem melhor, nem pior, apenas diferente.”

Autor desconhecido

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização química de polissacarídeos solúveis em água extraídos da casca de frutos de *Caryocar brasiliense* (pequi), bem como a avaliação das propriedades reológicas das soluções formadas por estes polissacarídeos. O fruto da espécie *Caryocar brasiliense* Cambess, conhecido popularmente como pequi, apresenta grande importância na cultura alimentar da população do cerrado, região onde se desenvolve naturalmente. Para os objetivos propostos, os diferentes constituintes da casca (pericarpo) foram desidratados e submetidos à sucessivas extrações aquosas. Todos os extratos resultantes apresentaram alto rendimento de polissacarídeos e elevada concentração de ácido galacturônico, arabinose e galactose, monossacarídeos característicos de pectinas. Os espectros de RMN de ^{13}C sugeriram a presença de homogalacturonanas α -(1 \rightarrow 4) ligadas, além de galactanas β -(1 \rightarrow 4) ligadas. Espectros de RMN de ^1H revelaram um alto grau de metoxilação e baixo grau de acetilação das homogalacturonanas. Após sucessivas diálises, as frações foram purificadas de sais e moléculas de baixa massa molecular, o que aumentou a concentração de ácidos urônicos como consequência do aumento na concentração de pectina. A estrutura proposta para as homogalacturonanas, bem como a presença dos substituintes metoxil e acetil foi confirmada após saponificação e carboxi-redução. Os resultados obtidos demonstraram a presença de pectinas majoritariamente do tipo homogalacturonana e cadeias laterais constituídas por arabinose e galactose, com alto grau de metoxilação e baixo grau de acetilação. Para a verificação, nas análises reológicas, do comportamento em curvas de fluxo, o extrato aquoso a quente do pericarpo, constituído principalmente por pectinas, foi utilizado nas concentrações de 10, 25, 35 e 50 g/L, adicionadas ou não de NaCl (0,2 e 0,4 M) e sacarose (50, 60 e 70% p/p) para verificação do comportamento em curvas de fluxo. As amostras apresentaram comportamento pseudoplástico e sua viscosidade aumentou com o aumento da concentração de polissacarídeo e sacarose, não sendo tão sensível, entretanto, à adição de NaCl. Para avaliação do comportamento das soluções em sistema dinâmico, testes em frequência oscilatória foram realizados com o polissacarídeo nas concentrações de 10, 25 e 35 g/L, adicionados de sacarose 50% e a concentração de 35 g/L com NaCl (0,2 e 0,4 M) e sacarose (50, 60 e 70%). Nas rampas de temperatura a amostra a 35 g/L adicionada de NaCl 0,2 M ou sacarose 50% foi utilizada. As amostras apresentaram comportamento de solução concentrada nas análises oscilatórias. Os valores dos módulos de armazenamento (G') e de perda (G''), tanto nas variações de frequência quanto nas de temperatura, foram maiores nas soluções mais concentradas, bem como nas adicionadas de sacarose. A presença de NaCl não surtiu efeito na melhora da estabilidade das soluções frente às variações de frequência e temperatura. As soluções formadas pela fração extraída a quente do pericarpo apresentaram comportamento pseudoplástico e não formaram géis, sendo classificadas como soluções concentradas cujos módulos G' e G'' foram dependentes da concentração de polissacarídeo e de sacarose, não sendo influenciadas por NaCl. Mais estudos concernindo a estrutura química dos polissacarídeos extraídos devem ser realizados a fim de se compreender completamente suas características e explicar seu comportamento em solução. Considerando tanto o rendimento quanto a estrutura química dos polissacarídeos isolados da casca do pequi, bem como suas propriedades reológicas, podemos

concluir que esta porção do fruto, outrora descartada, pode ser utilizada como fonte de pectinas para a indústria alimentícia. Neste setor, pode vir a ser aplicada como agente espessante, principalmente, e ser uma alternativa de aproveitamento da biomassa residual do fruto de pequi.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*; pequi; polissacarídeos, características químicas, reologia, pectinas.

ABSTRACT

The present work aimed the chemical characterization of soluble polysaccharides extracted from the peel of *Caryocar brasiliense* Cambess fruits, as well as the evaluation of the rheological properties of solutions of these polysaccharides. The fruit of *C. brasiliense* species, popularly known as Pequi, has a great importance in the food culture of the *cerrado* population, region where it naturally grows. For the proposed goals, the different parts of the peel, exocarp, external mesocarp, as well as the pericarp (external mesocarp + exocarp) were submitted to several aqueous extractions. All the resultant extracts presented a high concentration of galacturonic acid, arabinose and galactose, monosaccharides characteristic of pectins. The ^{13}C NMR spectrum confirmed the presence of a homogalacturonic-(1 \rightarrow 4)-linked main chain as well as branches of β -galactans-(1 \rightarrow 4)-linked. The ^1H NMR spectrum revealed a high degree of methoxylation and a low degree of acetylation of the polysaccharides. After successive dialysis, the fractions were purified of salts and low-mass molecules, and increased the concentration of uronic acids. The proposed structure as well as the presence of methoxyl and acetyl groups was confirmed after saponification and carboxi-reduction of the native polysaccharide. The aqueous-hot extract of the pericarp, mainly constituted by pectins, was used for the rheological analysis at different concentrations (10, 25, 35 e 50 g/L), added with NaCl (0,2 and 0,4 M) or sucrose (50, 60 and 70%) for verification of their behavior in the flow curves. For the oscillatory tests, concentrations of 10, 25 and 35 g/L with added sucrose 50% and a concentration of 35 g/L with NaCl (0,2 and 0,4 M) or sucrose (50, 60 and 70%) were used. On the temperature ladders the 35 g/L sample was added with NaCl 0,2 M or sucrose 50%. The samples presented a pseudoplastic behavior and of a high-concentration solution. The viscosity increased with the increase of the polysaccharide and sucrose concentration, not being as susceptible, however, to the addition of NaCl. In a similar way, G' and G'' values, both in the frequency and temperature variation, were higher on the more concentrated solutions, as well as the ones with added sucrose. The presence of NaCl did not show effect in improving the stability of the solutions in face of the different variations of frequency and temperature. The obtained results demonstrate the presence of pectins majorly of the homogalacturonic type and lateral chains made of arabinose and galactose, with a high degree of methoxylation and a low degree of acetylation. The solutions formed by the hot-aqueous extracted fractions of the pericarp presented a pseudoplastic behavior and did not formed gels, being classified as concentrated solutions which viscosity were dependent on the polysaccharide and sucrose concentration, not being influenced by NaCl. Further studies regarding the chemical structure of the extracted polysaccharides must be made in order to fully understand its characteristics and explain in detail its behavior in solution.

Key-words: *Caryocar brasiliense*; pequi, polysaccharides, chemical characteristics, rheology, pectins

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DAS PECTINAS	23
FIGURA 2 - TIPOS DE COMPORTAMENTO DE FLUXO E VISCOSIDADE DE LÍQUIDOS NEWTONIANOS E NÃO – NEWTONIANOS.	30
FIGURA 3 - PEQUIZEIRO.....	35
FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS PONTOS DE OCORRÊNCIA NATURAL DE PEQUI	36
FIGURA 5 - PEQUI - (A) CORTE TRANSVERSAL DO FRUTO; B) CORTE TRANSVERSAL DA POLPA CONTENDO A AMÊNDOA.	37
FIGURA 6 - SEQUÊNCIA DE EXTRAÇÕES AQUOSAS REALIZADAS NAS AMOSTRAS RETIRADAS DA CASCA DO PEQUI	42
FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO R DO PERICARPO PARA ANÁLISES REOLÓGICAS	45
FIGURA 8 - PADRÃO PARA DOSAGENS DE CARBOIDRATOS TOTAIS	61
FIGURA 9 - CURVA DE HIDRÓLISE DA AMOSTRA PE _q EM TFA 1 M	62
FIGURA 10 - CURVA DE HIDRÓLISE DA AMOSTRA PE _q EM TFA 2 M	63
FIGURA 11 - ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS DOS EXOCARPOS CLARO E ESCURO DE FRUTOS DE <i>Caryocar brasiliense</i>	67
FIGURA 12 - ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS DOS MESOCARPOS EXTERNOS CLARO E ESCURO DE FRUTOS DE <i>Caryocar brasiliense</i>	68
FIGURA 13 - ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS DOS PERICARPOS CLARO E ESCURO DE FRUTOS DE <i>Caryocar brasiliense</i>	69
FIGURA 14 - ESPECTROS DE ¹ H RMN DA AMOSTRA EC _f OBTIDOS ANTES E APÓS A SAPONIFICAÇÃO: (A) AMOSTRA NATIVA; (B) AMOSTRA SAPONIFICADA.....	70
FIGURA 15 - ESPECTRO DE ¹ H RMN DO PADRÃO DE PECTINA DE MAÇÃO SIGMA® E DAS AMOSTRAS EC _f , EC _q , EE _f E EE _q NATIVAS	72
FIGURA 16 - ESPECTRO DE ¹ H RMN DAS AMOSTRAS MC _f , MC _q , ME _f E ME _q NATIVAS.....	73
FIGURA 17 - ESPECTRO DE ¹ H RMN DAS AMOSTRAS PC _q E PE _q NATIVAS	74
FIGURA 18 - ESPECTRO DE ¹ H RMN E DAS AMOSTRAS EC _f , EC _q , EE _f E EE _q SAPONIFICADAS	75
FIGURA 19 - ESPECTRO DE ¹ H RMN DAS AMOSTRAS MC _f , MC _q , ME _f E ME _q SAPONIFICADAS	76
FIGURA 20 - ESPECTRO DE ¹ H RMN DAS AMOSTRAS PC _q E PE _q SAPONIFICADAS	77

FIGURA 21 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC - MALLS DAS FRAÇÕES DO MESOCARPO ESCURO E DOS PERICARPOS CLARO E ESCURO. (A) AMOSTRA MEf; (B) MEq; (C) PCq; (D) PEq	80
FIGURA 22 - COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMATOGRAMAS (DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) DAS AMOSTRAS MEf, MEf(d) E MEf(UP).....	81
FIGURA 23 - COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMATOGRAMAS (DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) DAS AMOSTRAS MEq, MEq(d) E MEq(UP).....	82
FIGURA 24 - COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMATOGRAMAS (DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) DAS AMOSTRAS PCq, PCq(d) E PCq(UP)	83
FIGURA 25 - COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMATOGRAMAS (DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) DAS AMOSTRAS PEq, PEq(d) E PEq(UP)	83
FIGURA 26 - COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMATOGRAMAS (DETECTOR DE ESPALHAMENTO DE LUZ) DAS AMOSTRAS MEf, MEf(d) E MEf(UP)	84
FIGURA 27 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC - MALLS DAS FRAÇÕES DOS EXOCARPOS CLARO E ESCURO. (A) AMOSTRA ECf(UP); (B) ECq(UP); (C) EEf(UP); (D) EEq(UP)	85
FIGURA 28 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC - MALLS DAS FRAÇÕES DOS MESOCARPOS CLARO E ESCURO. (A) AMOSTRA MCf(UP); (B) MCq(UP); (C) MEf(UP); (D) MEq(UP)	86
FIGURA 29 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC – MALLS DAS FRAÇÕES DOS PERICARPOS CLARO E ESCURO. (A) AMOSTRA PCq(UP); (B) PEq(UP)	87
FIGURA 30 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC – MALLS DA FRAÇÃO R	88
FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO R: (A) ESPECTRO DA FRAÇÃO NATIVA; (B) ESPECTRO DA FRAÇÃO SUBMETIDA À ULTRAFILTRAÇÃO	90
FIGURA 32 - CROMATOGRAMA DE HPSEC - MALLS DA FRAÇÃO R. (A) FRAÇÃO NATIVA; (B) FRAÇÃO SUBMETIDA À ULTRA-FILTRAÇÃO.....	91
FIGURA 33 (A) - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO R: (A) ESPECTRO DA FRAÇÃO NATIVA; (B) ESPECTRO DA FRAÇÃO SAPONIFICADA.....	92
FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO R: (A) ESPECTRO DA FRAÇÃO NATIVA; (B) ESPECTRO DA FRAÇÃO SAPONIFICADA E CARBOXI-REDUZIDA	94
FIGURA 35 - CURVA DE FLUXO DAS SOLUÇÕES DE POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO R EM ÁGUA E ADICIONADAS DE NaCl 0,2 E 0,4 M E SACAROSE 50, 60 E 70% (P/P), 25°C.....	96
FIGURA 36 - CURVAS DE VISCOSIDADE A 25°C DAS SOLUÇÕES DE POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO R EM ÁGUA E ADICIONADAS DE NaCl 0,2 E 0,4 M E SACAROSE 50, 60 E 70% (P/P).....	97
FIGURA 37 - EFEITO DA ADIÇÃO DE NaCl 0,2 E 0,4 M NOS MÓDULOS G' E G'' DA FRAÇÃO R A 35 g/L.....	102

FIGURA 38 - EFEITO DA ADIÇÃO DE SACAROSE A 50, 60 E 70% (P/P) NOS MÓDULOS G' E G'' DA FRAÇÃO R A 35 g/L.....103

FIGURA 39 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO NO COMPORTAMENTO DAS AMOSTRAS DA FRAÇÃO R A 10, 25 E 35 G/L ADICIONADA DE 50 DE SACAROSE (P/P) FRENTE ÀS VARIAÇÕES DE FREQUENCIA.....107
6

FIGURA 40 - VARIAÇÃO NO MÓDULO G' DAS AMOSTRAS 35G/L E 35G/L ADICIONADAS DE NaCl 0,2 M E SACAROSE 50% DURANTE AQUECIMENTO DE 5°C A 95°C E POSTERIOR RESFRIAMENTO DE 95°C A 5°C.....109

FIGURA 41 - VARIAÇÃO NOS MÓDULOS G' E G'' DA AMOSTRA 35G/L DURANTE AQUECIMENTO DE 5°C A 95°C E POSTERIOR RESFRIAMENTO DE 95°C A 5°C.....110

FIGURA 42 - VARIAÇÃO NOS MÓDULOS G' E G'' DA AMOSTRA 35G/L ADICIONADA DE NaCl 0,2 M DURANTE AQUECIMENTO DE 5°C A 95°C E POSTERIOR RESFRIAMENTO DE 95°C A 5°C.....110

FIGURA 43 - VARIAÇÃO NOS MÓDULOS G' E G'' DA AMOSTRA 35G/L ADICIONADA DE 50% DE SACAROSE DURANTE AQUECIMENTO DE 5°C A 95°C E POSTERIOR RESFRIAMENTO DE 95°C A 5°C111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TIPOS DE PECTINA EM RELAÇÃO AO TEMPO DE GELEIFICAÇÃO E GRAU DE ESTERIFICAÇÃO	26
TABELA 2 - RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS APÓS EXTRAÇÃO E DIÁLISES	56
TABELA 3 - TEORES DE AÇÚCARES TOTAIS, ÁCIDOS URÔNICOS E PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS EXTRAÍDAS DOS EXOCARPOS CLARO E ESCURO	58
TABELA 4 - TEORES DE AÇÚCARES TOTAIS, ÁCIDOS URÔNICOS E PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS EXTRAÍDAS DOS MESOCARPOS E PERICARPOS CLARO E ESCURO	59
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA ^a DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DOS EXOCARPOS DE FRUTOS DE <i>Caryocar brasiliense</i>	64
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA ^a DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DOS MESOCARPOS E PERICARPOS DE FRUTOS DE <i>Caryocar brasiliense</i>	65
TABELA 7 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS HIDROGÊNIO REFERENTES ÀS UNIDADES DE α -D-GalpA-(1→4) LIGADAS DAS AMOSTRAS EC _f NATIVA E APOS SAPONIFICAÇÃO	71
TABELA 8 - GRAU DE ESTERIFICAÇÃO E ACETILAÇÃO DAS FRAÇÕES PÉCTICAS OBTIDAS DA CASCA DE <i>Caryocar brasiliense</i>	78
TABELA 9 - RENDIMENTO, TEORES DE AÇÚCARES TOTAIS E URÔNICOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA ^a DA FRAÇÃO R SUBMETIDA À ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANA DE 1000 kDa	89
TABELA 10 - RENDIMENTO, TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA ^a DA FRAÇÃO R SUBMETIDA A CARBOXI-REDUÇÃO.....	93
TABELA 11 - COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO (R^2), OBTIDOS PELO AJUSTE DOS REOGRAMAS AOS MODELOS HERSCHEL-BULKLEY, BINGHAM E CASSON PARA A FRAÇÃO R <i>Caryocar brasiliense</i> EM ÁGUA E ADICIONADAS DE NaCl E SACAROSE A 25 °C.....	99
TABELA 12 - ÍNDICE DE COMPORTAMENTO DE FLUXO (n) – ADIMENSIONAL, COEFICIENTE DE CONSISTÊNCIA (K) – Pa.s ^{n} , TENSÃO DE ESCOAMENTO INICIAL (τ_0) – Pa E COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (R^2), OBTIDOS PELO AJUSTE DOS REOGRAMAS AO MODELO HERSCHEL-BULKLEY PARA AS SOLUÇÕES DE POLISSACARÍDEOS DE <i>Caryocar brasiliense</i> EM ÁGUA E ADICIONADAS DE NaCl E SACAROSE A 25 °C	100
TABELA 13 - MÉDIA DOS VALORES DE G' E G'' MEDIDOS A 1 E 10 HZ PARA AS SOLUÇÕES DE POLISSACARÍDEOS DE <i>Caryocar brasiliense</i> EM ÁGUA E ADICIONADAS DE NaCl E SACAROSE A 25 °C	104

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ca^{2+} - cálcio

Centrif. – centrifugação

CH_3OH – grupo acetil

COO^- - grupo carboxila

COCH_3 – grupo carboxila metil-esterificado

^{13}C RMN - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13

DA - Grau de acetilação

DE - Grau de esterificação

DM – Grau de metoxilação

DNS - dinitrosalicilato

D_2O - Óxido de deutério

ECf – fração polissacarídica extraída a frio do exocarpo claro

ECf(d) - fração polissacarídica extraída a frio do exocarpo claro e dialisada contra água destilada

ECf(UP) - fração polissacarídica extraída a frio do exocarpo claro e dialisada contra água ultra-pura

ECq - fração polissacarídica extraída a quente do exocarpo claro

ECq(d) - fração polissacarídica extraída a quente do exocarpo claro e dialisada contra água destilada

ECq(UP) - fração polissacarídica extraída a quente do exocarpo claro e dialisada contra água ultra-pura

EEf - fração polissacarídica extraída a frio do exocarpo escuro

EEf(d) - fração polissacarídica extraída a frio do exocarpo escuro e dialisada contra água destilada

EEf(UP) - fração polissacarídica extraída a frio do exocarpo escuro e dialisada contra água ultra-pura

EEq - fração polissacarídica extraída a quente do exocarpo escuro

EEq(d) - fração polissacarídica extraída a quente do exocarpo escuro e dialisada contra água destilada

EEq(UP) - fração polissacarídica extraída a quente do exocarpo escuro e dialisada contra água ultra-pura

FT-IR - Espectroscopia no infravermelho incorporando transformado r Fourier

G' - Módulo de armazenamento ou módulo de cisalhamento elástico

G'' - Módulo de perda ou módulo de cisalhamento viscoso

G* - Módulo de cisalhamento complexo

GLC - Cromatografia líquido-gasosa

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

HG - Homogalacturonana

HM - Pectinas com grau de esterificação superior a 50%

HPSEC - Cromatografia de exclusão estérica de alta performance

¹H RMN - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton

I – integral

IR – índice de refração

K – valor de consistência

LM - Pectinas com grau de esterificação inferior a 50%

MALLS - Detector de espalhamento de luz laser em multiângulos

MCf – fração polissacarídica extraída a frio do mesocarpo claro

MCf(d) - fração polissacarídica extraída a frio do mesocarpo claro e dialisada contra água destilada

MCf(UP) - fração polissacarídica extraída a frio do mesocarpo claro e dialisada contra água ultra-pura

MCq - fração polissacarídica extraída a quente do mesocarpo claro

MCq(d) - fração polissacarídica extraída a quente do mesocarpo claro e dialisada contra água destilada

MCq(UP) - fração polissacarídica extraída a quente do mesocarpo claro e dialisada contra água ultra-pura

MEf - fração polissacarídica extraída a frio do mesocarpo escuro

MEf(d) - fração polissacarídica extraída a frio do mesocarpo escuro e dialisada contra água destilada

MEf(UP) - fração polissacarídica extraída a frio do mesocarpo escuro e dialisada contra água ultra-pura

MEq - fração polissacarídica extraída a quente do mesocarpo escuro

MEq(d) - fração polissacarídica extraída a quente do mesocarpo escuro e dialisada contra água destilada

MEq(UP) - fração polissacarídica extraída a quente do mesocarpo escuro e dialisada contra água ultra-pura

Me₂SO - Dimetil-sulfóxido

MHz – megahertz

n – índice de comportamento de fluxo

η- Viscosidade

η* - Viscosidade dinâmica complexa

η_∞ - valor finito e constante de viscosidade em taxas de cisalhamento extremamente altas

τ - tensão de cisalhamento

τ₀ - tensão de escoamento inicial

$\dot{\gamma}$ - taxa de cisalhamento

NaBD₄ - Boroidreto de sódio deuterado

NaBH₄ - Boroidreto de sódio

NaCl – cloreto de sódio

NaN₃ - Azida de sódio

NaNO₂ - Nitrito de sódio

NaOD – deuteróxido de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

Pa - pascal

Pa.s – Pascal por segundo

PCq – fração polissacarídica extraída a quente do pericarpo claro

PCq(d) – fração polissacarídica extraída a quente do pericarpo claro e dialisada contra água destilada

PCq(UP) - fração polissacarídica extraída a quente do pericarpo claro e dialisada contra água ultra-pura

PEq – fração polissacarídica extraída a quente do pericarpo escuro

PEq(d) – fração polissacarídica extraída a quente do pericarpo escuro e dialisada contra água destilada

PEq(UP) - fração polissacarídica extraída a quente do pericarpo escuro e dialisada contra água ultra-pura

R – fração polissacarídica extraída do pericarpo escuro para as análises reológicas

R^2 – coeficiente de determinação

R-CR – fração polissacarídica extraída do pericarpo escuro para as análises reológicas e submetida à carboxi-redução.

R1000 - fração polissacarídica extraída do pericarpo escuro para as análises reológicas retida em membrana de 1000 kDa durante processo de ultra-filtração

Ressusp. – ressuspendido

RG - Ramnogalacturonana

RG-I - Ramnogalacturonana do tipo I

RG-II - Ramnogalacturonana do tipo II

RI - Índice de refração

RMN - Ressonância magnética nuclear

RMN ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13.

RMN ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RVL – região viscoelástica linear

TFA – ácido trifluoroacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Objetivo geral	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Parede celular vegetal.....	17
2.2 Pectinas.....	20
2.2.1 Estrutura química das pectinas	21
2.2.2 Função das Pectinas na Parede Celular Vegetal.....	24
2.2.3 Mecanismos de geleificação de pectinas	25
2.3 Pectinas e Reologia.....	27
2.3.1 Viscoelasticidade.....	33
2.4 <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Obtenção dos materiais	40
3.2 Extração de polissacarídeos solúveis em água	41
3.3 Purificação das amostras	42
3.4 Diálise das frações	43
3.5 Extração de polissacarídeos solúveis para análises reológicas	43
3.6 Ultra-filtração da amostra R	44
3.7 Dosagens colorimétricas.....	46
3.7.1 Dosagem de carboidratos totais.....	46
3.7.2 Determinação do teor de proteínas	46
3.7.3 Dosagens de ácidos urônicos	47
3.8 Ressonância magnética nuclear	47
3.8.1 Ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN- ^{13}C).....	47
3.8.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN- ^1H)	48
3.8.2.1 Determinação do grau de acetilação (DA) e metoxilação (DM) por RMN de ^1H	48
3.9 Análise da Composição Monossacarídica	49
3.9.1 Hidrólise ácida.....	49

3.9.1.1 Curva de hidrólise	49
3.9.2 Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise.....	50
3.9.3 Carboxi – redução das frações polissacarídicas	50
3.10 Análises Cromatográficas	51
3.10.1 Cromatografia Líquido-Gasosa	51
3.10.2 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS)	51
3.10.3 Cromatografia de exclusão estérica de alto rendimento (HPSEC-MALLS-RID)	52
3.11 Análises Reológicas.....	53
3.11.1 Preparo da amostra para análises reológicas	53
3.11.2 Curvas de fluxo	54
3.11.3 Varredura de Tensão.....	55
3.11.4 Varredura de Frequência.....	55
3.11.5 Análises dinâmicas termomecânicas.....	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Composição química das frações polissacarídicas obtidas da casca de Pequi	56
4.1.1 Composição Monossacarídica	62
4.2 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C das frações polissacarídicas de <i>Caryocar brasiliense</i>	66
4.3 Ressonância magnética nuclear de ¹H – determinação do grau de metoxilação e acetilação	69
4.4 Análise por HPSEC-MALLS	78
4.5 Ultra-filtração da fração polissacarídica	88
4.6 Carboxi-redução da fração polissacarídica R.....	92
4.7 Análises Reológicas	94
4.7.1 Comportamento em fluxo estacionário de polissacarídeos provenientes de <i>Caryocar brasiliense</i>	94
4.7.2 Análises Reológicas Oscilatórias Dinâmicas de polissacarídeos provenientes de <i>Caryocar brasiliense</i>	101
4.7.3 Análises Dinâmicas Termomecânicas.....	108
5 CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS.....	115

1 INTRODUÇÃO

Pectinas são polissacarídeos provenientes das paredes celulares primárias e das regiões intercelulares de vegetais superiores. Constituem um importante e complexo grupo de carboidratos há muito utilizados na indústria de alimentos e na nutrição humana. Na indústria, são utilizados como espessantes e estabilizantes devido à sua capacidade de formar gel em determinadas condições. Na natureza, são responsáveis por importantes propriedades intrínsecas aos vegetais, dentre as quais se destacam as propriedades reológicas da parede celular, fundamentais para a fisiologia da mesma nos diversos estágios de amadurecimento vegetal. Dada a sua natureza de fibra alimentar, as pectinas são de elevada importância na dieta humana, com benefícios cientificamente comprovados evidenciados em todo o organismo.

O fruto da espécie *Caryocar brasiliense* Cambess, conhecido popularmente como Pequi, apresenta grande importância na cultura alimentar da população do cerrado, região onde se desenvolve naturalmente. O fruto é dividido em exocarpo, mesocarpo externo, mesocarpo interno ou polpa (porção comestível do fruto), endocarpo e amêndoa. O exocarpo e o mesocarpo externo equivalem ao pericarpo ou casca, porção espessa e correspondente a aproximadamente 84% do peso total do fruto. Uma vez que as cascas são dispensadas em lixo comum, sua elevada proporção no fruto contribui para o aumento da massa dos lixões e, portanto, representa um problema ambiental.

Como o pericarpo constitui uma porção não aproveitada do pequi, a extração de pectina poderia ser uma alternativa de utilização deste resíduo, o que minimizaria os problemas ambientais decorrentes do acúmulo de massa nos lixões, além de fornecer uma fonte alternativa do polissacarídeo para o processamento de geléias e outros produtos industrializados que necessitem de pectinas adicionais em sua formulação.

Assim sendo, justifica-se o estudo de possibilidades de utilização desta biomassa no que concerne ao estudo de suas pectinas, visando o aproveitamento

industrial deste material, tendo em vista que as pectinas são polissacarídeos de grande importância na produção de alimentos e na saúde humana.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Extrair e caracterizar química e estruturalmente os polissacarídeos solúveis em água da casca (exocarpo e mesocarpo externo) do fruto de *Caryocar brasiliense* e avaliar as propriedades reológicas da solução formada por esta fração, visando sua aplicação como espessante e estabilizante em indústria de alimentos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Extrair os polissacarídeos solúveis em água presentes no exocarpo e no mesocarpo externo dos frutos de *Caryocar brasiliense*, objetivando o maior rendimento possível sem oferecer condições drásticas à molécula;
- Determinar o rendimento, teor de açúcares totais, ácidos urônicos e proteínas através de dosagens colorimétricas;
- Determinar a composição monossacarídica e a estrutura química das frações polissacarídicas obtidas (GLC, GC-MS e RMN);
- Avaliar as propriedades reológicas dos polissacarídeos solúveis em água isolados das cascas de *Caryocar brasiliense*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Parede celular vegetal

As paredes celulares são em geral classificadas em dois tipos principais: primárias e secundárias. As paredes primárias são finas, extensíveis e predominam nas células em crescimento, sendo de fundamental importância no processo de expansão celular. Geralmente não são especializadas e, portanto, assemelham-se quanto à arquitetura molecular em todos os tipos celulares, embora sua aparência possa exibir ampla variação (TAIZ; ZEIGER, 2009). Tecidos jovens, que apresentam predominantemente finas paredes celulares primárias, são relativamente macios e sua rigidez é mantida pelo turgor da célula (REID, 1997).

Quando as células perdem a capacidade de crescer e dividir, podem se diferenciar em tipos especializados, muitos dos quais com paredes celulares espessas. Tal espessamento é proveniente de depósitos de materiais (predominantemente carboidratos) estabelecidos entre a parede celular primária e a membrana plasmática da célula. Este espessamento das paredes primárias geram as paredes secundárias, as quais, ao contrário da primeira, apresentam estruturas e composição altamente especializadas. Paredes secundárias são importantes ao fornecerem rigidez aos tecidos, independente do turgor exercido pelo protoplasto (REID, 1997). Em muitos tipos, a deposição de lignina - um tipo de composto fenólico que fornece resistência, rigidez, impermeabilização e proteção mecânica contra invasores à parede celular de células vegetais – nas paredes secundárias promove dureza ao tecido, principalmente naqueles que possuem funções mecânicas ou de sustentação (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007; REID, 1997). A lignificação geralmente é seguida de morte celular (REID, 1997).

Os carboidratos estruturais são os principais constituintes orgânicos da maioria dos tecidos das plantas. Isto porque os carboidratos constituem a estrutura de suporte celular vegetal – a parede celular. Conseqüentemente, juntos, os carboidratos estruturais das plantas são os componentes naturais mais abundantes presentes na natureza (REID, 1997). Estes polímeros são uma fonte natural

renovável e podem ser utilizados como fonte de energia e matéria-prima em processos industriais, como na indústria de papel, têxtil, fibras, carvão vegetal, madeira, entre outras, sendo, portanto, além de sua relevância biológica, de extrema importância na economia (REID, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2009).

A parede celular é responsável pela regulação do volume e forma celular, proteção do protoplasto, adesão das células e restrição do movimento celular, morfogênese vegetal, balanço hídrico das plantas, controle da difusão de biomoléculas, dentre outras. Esta diversidade de funções requer uma estrutura molecular diversa e complexa, que varia conforme o tipo de espécies, célula e estágio do desenvolvimento (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O principal componente da parede celular é a celulose, a qual determina em grande parte sua arquitetura. A celulose é formada por unidades de D-glucose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4), organizadas em microfibrilas de tamanho variável. As microfibrilas de celulose são estruturas relativamente rígidas que contribuem para a resistência e disposição estrutural da parede celular (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Os polissacarídeos individuais que a constituem são firmemente alinhados e ligados entre si por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, formando uma fita altamente ordenada e cristalina que exclui a água e é relativamente inacessível ao ataque enzimático, o que a torna forte, estável e resistente à degradação (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2009). As microfibrilas não são organizadas ao acaso, o que implica um alto grau de controle sobre sua biosíntese e deposição na parede (REID, 1997).

À celulose, ligam-se moléculas de hemiceluloses com até 400 nm de comprimento através de ligações de hidrogênio cruzadas (McCANN e ROBERTS, 1996), formando correntes que reúnem as microfibrilas em uma rede coesa e um revestimento fluido que impede o contato direto microfibrila – microfibrila (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As hemiceluloses constituem um grupo heterogêneo de polissacarídeos. Nas paredes celulares primárias de dicotiledôneas, a hemicelulose mais comum é a xiloglucana, uma molécula composta por uma estrutura básica formada por unidades de D-glucose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4), à qual ligam-se, através de ligações (1 \rightarrow 6), cadeias laterais que contêm xilose, galactose e, algumas vezes, fucose.

Estas cadeias laterais impedem a formação de microfibrilas cristalinas como no caso da celulose, tornando a molécula longa e, logo, capaz de ligar várias microfibrilas de celulose umas às outras. Outras hemiceluloses, como glucoarabinoxilanas e glucomananas, apresentam-se em quantidades importantes principalmente em paredes secundárias e paredes celulares de gramíneas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Nesta rede de celulose – hemicelulose, as pectinas formam uma fase gel hidratada que funciona como uma segunda rede, a qual impede a agregação e colapso da rede de celulose, limita a porosidade, modula o pH e o balanço iônico da parede (CARPITA; GIBEAUT, 1993; TAIZ; ZEIGER, 2009; McCANN e ROBERTS, 1996). Apesar de ser coextensiva à formada pelas microfibrilas de celulose e hemicelulose, esta rede de pectina é independente (CARPITA; GIBEAUT, 1993), já que sua relativa facilidade de extração com agentes químicos não afeta a integridade da estrutura da rede de celulose-hemicelulose, apenas aumenta a porosidade da malha formada por estes polissacarídeos (McCANN e ROBERTS, 1996).

As interações entre as microfibrilas de celulose e os componentes pécticos da matriz são comparadas a um cristal em estado líquido. Estes polissacarídeos da matriz mantêm as microfibrilas de celulose juntas e são os principais responsáveis pela resistência à pressão exercida pelo turgor do protoplasto. A remoção da matriz de pectina aumenta consideravelmente a mobilidade dos demais polissacarídeos da parede. Sendo assim, a orientação de síntese das microfibrilas de celulose estabelecem o formato da célula, ao passo que a interação dinâmica entre os polissacarídeos da matriz e a celulose dita a taxa de expansão celular (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Na região intercelular há uma fina camada de material, rico em pectinas, denominada lamela média, responsável pela adesão célula-célula e resistência do tecido (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007; REID, 1997).

2.2 Pectinas

As pectinas constituem um importante grupo de carboidratos na indústria de alimentos e na nutrição humana. Também chamadas de substâncias pécticas, as pectinas formam um grupo bastante heterogêneo de polissacarídeos fortemente associados e são depositadas, sobretudo, nos estágios primários de desenvolvimento vegetal, quando a área da parede celular é continuamente aumentada (REID, 1997; VORAGEN *et al.*, 1995).

A textura de frutas e vegetais durante o crescimento, amadurecimento e armazenamento é fortemente influenciada pelo teor e natureza das pectinas presentes. Mudanças importantes nas propriedades de produtos derivados de vegetais são relacionadas a alterações nos componentes pécticos dos mesmos (VORAGEN *et al.*, 1995).

Sob certas condições, estes polissacrídeos são capazes de formar géis e esta propriedade as torna um importante aditivo espessante em geléias, balas de goma, produtos de confeitaria, dentre outros. A produção de pectinas é voltada, principalmente, para a produção de geléias de frutas, para compensar a deficiência natural de pectina nestas frutas, de modo a atingir a textura desejável do produto. Outra aplicação das pectinas é na produção de bases de frutas para adição em iogurtes e outros produtos lácteos, dada sua relativa estabilidade em meio ácido (VORAGEN *et al.*, 1995).

As fontes mais comuns de pectina são cascas de frutas cítricas e o bagaço da maçã, provenientes principalmente da indústria de sucos (TOWLE; CHRISTENSEN, 1973), embora também possa ser extraída da polpa da beterraba durante o processo de extração de açúcar (FUNAMI *et al.*, 2009).

Como fibra alimentar, as pectinas possuem propriedades relacionadas à promoção da saúde devido a efeitos benéficos no organismo humano, tais como: diminuição do colesterol sanguíneo total e/ou colesterol LDL, redução do risco de câncer, aumento do peristaltismo intestinal, atenuação da glicemia pós-prandial, redução da pressão sanguínea, aumento da massa fecal (associado à efeito laxativo), diminuição do tempo de trânsito intestinal, modulação da flora intestinal

com aumento da fermentação colônica relacionada à produção de ácidos graxos de cadeia curta, diminuição da adiposidade e aumento da saciedade (HOWLETT *et al.*, 2010; FAO/OMS, 2004).

O uso das pectinas como aditivos em alimentos passou a ser considerado, a partir de 1969, seguro e permitido pela FAO/OMS *Food Standards Program Codex Committee on Food Additives*, sem limites na ingestão diária recomendada, exceto como previsto pelas boas práticas de fabricação (TOWLE; CHRISTENSEN, 1973).

2.2.1 Estrutura química das pectinas

Pectinas são polissacarídeos complexos no que concerne à sua estrutura química, a qual varia com a fonte e condições utilizadas em seu isolamento (TOWLE; CHRISTENSEN, 1973).

Os polissacarídeos pécticos são formados por uma estrutura em cadeia de unidades de ácido D-galacturônico, em forma piranosídica, unidas covalentemente por ligações α -(1→4) podendo, em algumas partes, ser interrompida pela inserção de resíduos de L-ramnosil ligados α -(1→2) em posições alternadas ou adjacentes. Na cadeia de galacturonana, proporções variáveis de grupos carboxílicos das unidades monossacarídicas estão presentes como metil-ésteres (REID, 1997).

Outros constituintes estão ligados em cadeias laterais, sendo os mais comuns D-galactose, L-arabinose e D-xilose. Outros como D-glucose, D-manose, L-fucose e ácido D-glucurônico são encontrados com menos frequência. Alguns monossacarídeos mais raros, como 2-O-metilfucose, 2-O-metilxilose, D-apiose, 3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilose e o ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico, foram encontrados em certas frações isoladas de parede celular de células de sicômoro (*Ficus sycomorus*) (VORAGEN *et al.*, 1995).

As cadeias laterais são glicosidicamente ligadas à principal por meio do oxigênio quatro (O-4) e/ou oxigênio três (O-3) dos resíduos L-ramnopiranosil ou do oxigênio dois (O-2) ou três (O-3) de alguns resíduos galacturonopiranosil (VORAGEN *et al.*, 1995).

Arabinanas constituem um tipo de cadeia lateral, podendo ser encontradas em pectinas originárias de um grande número de fontes, tais como beterraba, amendoim e pectinas cítricas (ASPINALL, 1970). Possuem um esqueleto formado por resíduos de L-arabinofuranoses unidas por ligações α -(1 \rightarrow 5) ao qual ligam-se unidades individuais de α -L-arabinofuranoses na posição O-3 (PÉREZ, MAZEAU; Du PENHOAT, 2000).

As arabinogalactanas, outro tipo de cadeia lateral das pectinas, por sua vez, ocorrem em duas formas estruturalmente diferentes. Arabinogalactanas tipo I tem uma cadeia linear formada por unidades de β -D-galactopiranosil unidas por ligações (1 \rightarrow 4) com 20-40% de resíduos de α -L-arabinofuranose ligados (1 \rightarrow 5) em pequenas cadeias laterais, conectadas geralmente ao oxigênio do carbono três (O-3) das unidades de galactose (PÉREZ, MAZEAU; Du PENHOAT, 2000; VORAGEN *et al.*, 1995). As do tipo II, entretanto, são polissacarídeos altamente ramificados com cadeias laterais compostas por resíduos de β -D-galactopiranosil unidos por ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6). As ligações (1 \rightarrow 3) ocorrem predominantemente nas cadeias internas, enquanto que as (1 \rightarrow 6) prevalecem nas externas, as quais são frequentemente terminadas por L-arabinofuranoses e em certo grau por L-arabinopiranoses (TOWLE; CHRISTENSEN, 1973; VORAGEN *et al.*, 1995).

As ramnogalacturonanas (RG) são um tipo peculiar de polissacarídeos pécticos. As do tipo I (RGI) contém um esqueleto principal composto por unidades alternadas de L-ramnose ligadas α -(1 \rightarrow 2) e ácido D-galacturônico ligadas α -(1 \rightarrow 4). Aproximadamente metade dos resíduos de ramnose da cadeia principal são substituídos por cadeias laterais em O-4. Estas, por sua vez, são compostas por D-galactoses e L-arabinofuranoses. Já as ramnogalacturonanas do tipo II (RGII) possuem uma estrutura bastante complexa, com uma proporção elevada de resíduos ramnosil, ligados entre si por ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 2,3,4) e também como unidade terminal, em contraste com as RG I, que possuem ligações predominantemente do tipo (1 \rightarrow 2) substituído em O-4 e (1 \rightarrow 2,4). Na elucidação de sua estrutura foram encontrados aproximadamente 20 tipos de monossacarídeos, entre eles os mais raros citados anteriormente (RODRIGUEZ-CARVAJAL *et al.*, 2003).

A estrutura geral proposta para polissacarídeos pécnicos é ilustrada na Figura 1.

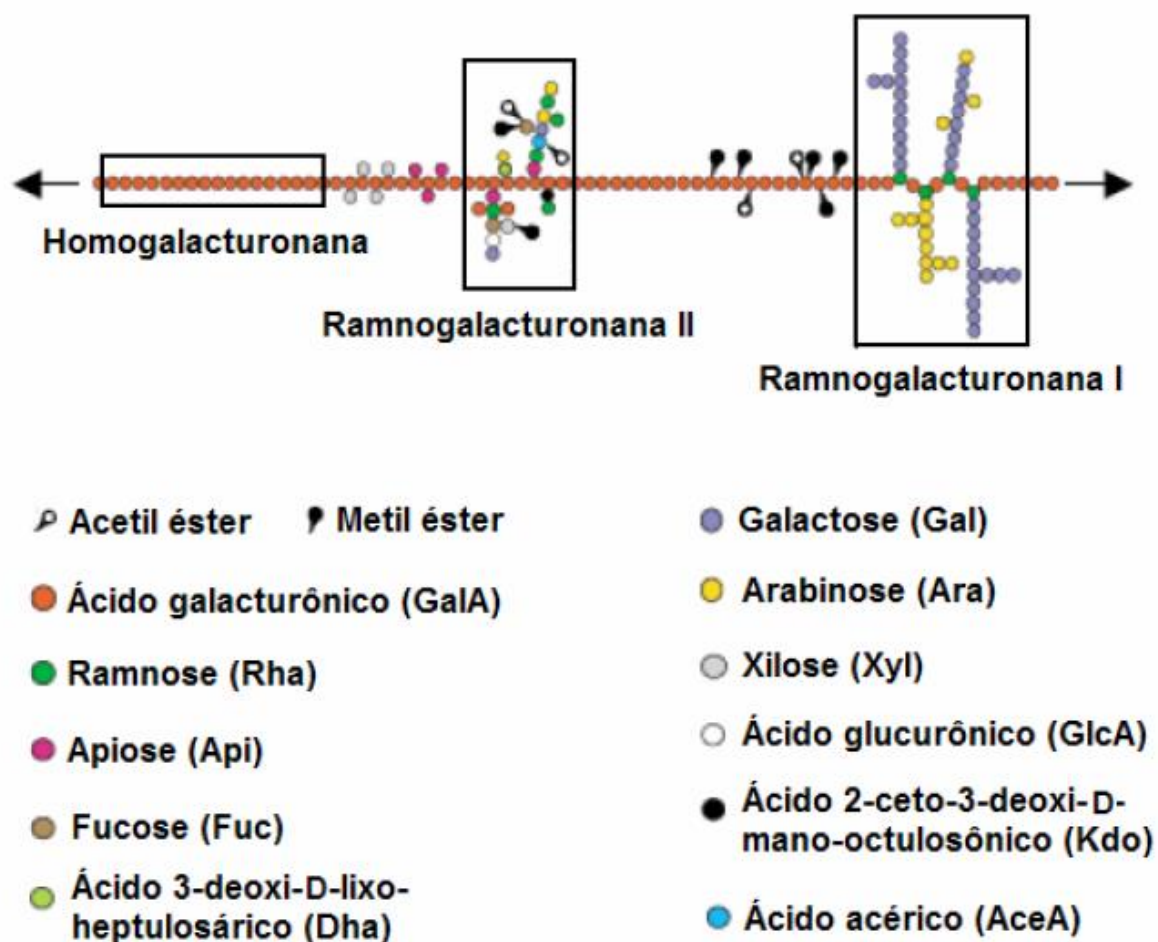


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DAS PECTINAS
ADAPTADO DE: WILLATS; KNOX e MIKKELSEN (2006).

Nas RGs ocorre uma distribuição intramolecular na qual os açúcares neutros constituintes das cadeias laterais concentram-se em blocos em regiões mais substituídas da cadeia principal, conhecidas como *hairy regions*, as quais separam-se umas das outras por regiões não substituídas, ou *smooth regions* (DE VRIES *et al*, 1982; VORAGEN *et al*, 1995)

As pectinas também podem estar ligadas a substituintes diferentes dos carboidratos, como metanol, ácido acético, ácidos fenólicos e amido. A esterificação

dos ácidos galacturônicos com metanol e ácido acético é uma característica estrutural particularmente importante das pectinas (VORAGEN *et al.*, 1995).

O grau de metoxilação (DM) é definido como a porcentagem de grupos carboxílicos esterificados com metanol. Segundo o grau de metoxilação, as pectinas podem ser HM (do inglês *high methoxy*) ou LM (*low methoxy*). Pectinas HM possuem mais de 50% dos grupos carboxílicos esterificados com metanol, enquanto as LM possuem menos de 50%. Se menos de 10% dos grupos carboxílicos apresentam-se metil-esterificados, diz-se que a substância é um ácido péctico (ROLIN, 1993).

O grau de acetilação (DA) é definido como o grau de resíduos de ácido galacturônico esterificados com um grupo acetil. A acetilação ocorre principalmente em O-2 e em O-3 (VORAGEN *et al.*, 1995).

Em relação à solubilidade, são geralmente solúveis em água, DMSO, formamida, dimetilformamida e glicerol quente e são insolúveis na maioria dos solventes orgânicos. Pectinatos de sódio são mais solúveis do que ácidos pécticos, os quais, por sua vez, são mais solúveis que os pectinatos de cálcio.

2.2.2 Função das Pectinas na Parede Celular Vegetal

Na célula, as regiões de interface celular como a lamela média e os “cantos celulares”, região mais angulosa da célula, são ricas em pectinas relativamente não esterificadas; Na lamela média estas moléculas atuam na adesão célula-célula e nos “cantos celulares” exercem um importante papel na estrutura e integridade tecidual, pois esta região atua como uma “viga”, suportando grande parte da carga mecânica do tecido (McCANN e ROBERTS, 1996).

As pectinas apresentam também um importante papel na defesa da parede celular ao “enredar” organismos invasores e sinalizar mecanismos de defesa celulares, que operam através da liberação de pequenos fragmentos pécticos (CARPITA; GIBEAUT, 1993; McCANN e ROBERTS, 1996).

Durante o crescimento celular a parede deve ser modificada para permitir a expansão do conteúdo da célula. Neste processo ocorre o alongamento da parede, acompanhado do aumento da massa de todos os seus polímeros e de mudanças em ambas as redes, tanto a de celulose - hemicelulose quanto a de pectina (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Uma das alterações mais comuns que ocorre na rede de pectinas durante a expansão da parede é a metil-esterificação dos grupos carboxílicos das unidades de ácido galacturônico, que resulta na diminuição das cargas negativas necessárias para as ligações cruzadas com o cálcio. A rede de pectinas não-esterificadas é substituída por outra formada por moléculas altamente esterificadas recém-sintetizadas. As moléculas não-esterificadas são secretadas no meio e podem contribuir para o aumento na superfície da lamela média durante o crescimento celular (McCANN e ROBERTS, 1996).

Modificações no grau de esterificação dos ácidos poligalacturônicos e o tamanho, frequência e conformação das zonas de junção das moléculas podem influenciar a densidade de cargas e a porosidade do gel de pectina. O afrouxamento desta rede gera alterações nas propriedades reológicas da parede, de modo a formar um tipo de arquitetura favorável ao alongamento e expansão e influenciar o metabolismo da rede de celulose/xiloglucana (McCANN e ROBERTS, 1996).

2.2.3 Mecanismos de geleificação de pectinas

O comportamento das pectinas em meio ácido ou neutro determina sua funcionalidade como um constituinte natural de muitos materiais vegetais e seu uso como aditivo em produção de alimentos para geleificação e espessamento de certos produtos.

Géis de pectinas são formações tridimensionais de moléculas de pectinas entrelaçadas, nas quais o solvente (água) mais seus co-solutos (açúcar e sais) são imobilizados, resultando em um sistema resistente a deformação (VORAGEN *et al.*, 1995).

A força destes géis, ou seja, sua resistência à tração, bem como o tempo requerido para sua formação são os fatores mais importantes para se classificar um tipo de pectina de acordo com seu comportamento em dado meio. O tempo de geleificação é definido como o intervalo entre o momento em que se estabelecem as condições para a formação do gel e o momento em que este gel se consolida. Este intervalo é de considerável importância prática por muitas razões, sendo o tempo disponível para o empacotamento dos produtos gelificados na indústria a mais significativa (TOWLE; CHRISTENSEN, 1973).

Pectinas comerciais são geralmente agrupadas em tipos rápido, médio, ou lento, de acordo com seu tempo de geleificação, o qual é fortemente influenciado pelo grau de esterificação das molécula. Na Tabela 1 são apresentados os tipos de pectina, relacionados aos seus respectivos graus de esterificação e tempos de geleificação.

TABELA 1 - TIPOS DE PECTINA EM RELAÇÃO AO TEMPO DE GELEIFICAÇÃO E GRAU DE ESTERIFICAÇÃO

Tipo de pectina	Grau de esterificação (%)	Tempo de gelificação (seg)
Rápido	72 - 75	20 – 70
Médio	68 - 71	100 – 135
Lento	62 - 66	180 - 250

ADAPTADO DE: Towle; Christensen (1973).

A força de um gel de pectina depende da formação de zonas de junção intermolecular entre diferentes cadeias de homogalacturonanas (*smooth regions*). Estas zonas de junção são estabilizadas por ligações de hidrogênio entre o grupo carboxil de uma molécula e grupos hidroxila secundários de outra, bem como por interações hidrofóbicas entre grupos metoxil. A resistência à tração depende do número destas zonas por unidade molecular. Por isso é que, para um gel com alta resistência à tração, pectinas com elevado peso molecular são desejáveis, sendo que o comprimento das moléculas contribuem mais do que o peso molecular médio das cadeias de pectina envolvidas no gel (VORAGEN *et al.*, 1995; McCANN e ROBERTS, 1996). Para evitar a formação de micelas com conseqüente turbidez e

precipitação, deve haver zonas de junção nas regiões terminais das cadeias de pectina (VORAGEN *et al.*, 1995).

Muitos fatores influenciam as condições de formação do gel e a força deste. Para pectinas HM, altas concentrações de açúcar em meio ácido favorecem a formação de géis. O açúcar promove o abaixamento da atividade de água, o que ocasiona mais interações das cadeias entre si do que destas com o solvente e o pH ácido elimina as cargas negativas dos grupos carboxílicos, diminuindo assim a repulsão eletrostática entre as cadeias, facilitando sua interação (VORAGEN *et al.*, 1995). Pectinas LM, por outro lado, formam géis em presença de cátions divalentes, preferencialmente cálcio (Ca^{2+}). O cálcio liga grupos carboxila (COO^-) carregados dos ácidos urônicos de moléculas vizinhas, formando uma espécie de ponte entre as cadeias, o que cria um complexo altamente resistente (TAIZ; ZEIGER, 2009). Nas moléculas altamente metoxiladas, a presença de cálcio não afeta significativamente a formação do gel.

Há uma crescente demanda entre os consumidores de geléias por produtos com teor de açúcar reduzido ou mesmo por produtos isentos de açúcar, em parte devido à busca por produtos com baixa caloria, em parte para suprir a necessidade de produtos dietéticos para diabéticos. O sabor doce em tais produtos pode ser providenciado pela adição de adoçantes sintéticos. Entretanto, devido ao reduzido teor de açúcar nestes produtos, pectinas com alto grau de metoxilação não são convenientes e, portanto, o uso de pectinas pouco metoxiladas e cálcio, de modo a formar um gel pectina-cálcio, torna-se necessário (TOWLE; CHRISTENSEN, 1973).

2.3 Pectinas e Reologia

Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas sobre polissacarídeos como aditivos na produção de alimentos, correlacionando suas propriedades físicas e químicas com seu comportamento em soluções, visando aprimorar a qualidade dos produtos alimentícios e reduzir os custos com sua produção. Substâncias hidrocolóides, como certos tipos de polissacarídeos incluindo as pectinas, exercem

um importante papel na aceitabilidade de produtos alimentícios por aumentar a estabilidade de alimentos e as sensações palatais gerais, sensações estas que podem ser vitais para conseguir a aceitação do consumidor (JOHNSTON-BANKS, 1990, citado por MARCOTTE; HOSHAHILI; RAMASWAMY, 2001; TONELI; MURR; PARK, 2005).

Diversos tipos de polissacarídeos são incorporados a uma ampla gama de formulações de alimentos. Particularmente, são utilizados para oferecer resistência aos processos físicos indesejáveis como cristalização, sedimentação e desagregação mecânica, o que pode ocorrer durante a distribuição e o armazenamento (OSMAN, 1975; HOUSKA *et al*, 1998).

Steffe (1996) sugere que a reologia é a ciência dos materiais em alimentos. O estudo das propriedades reológicas de sistemas de polissacarídeos pécticos, no contexto da tecnologia de alimentos, nos fornece informações que podem influenciar na seleção do equipamento de fabricação a ser utilizado em sua produção, bem como o seu modo de processamento, devendo anteceder qualquer procedimento que envolva sua utilização.

O termo reologia, sugerido por Bingham e Crawford, denomina a ciência que estuda a deformação e o fluxo da matéria, quando esta é submetida a tensões (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SINKO, 2008). Quando um fluido é mantido entre duas placas paralelas, onde a superior é móvel e a inferior estacionária, ao se aplicar tangencialmente uma força F na placa superior, a velocidade do fluxo gerado é máxima na camada ligada diretamente à placa móvel e decresce paralelamente através das camadas adjacentes do fluido, até chegar a zero na camada ligada à placa estacionária. Isso ocorre devido à resistência interna do fluido, ou seja, sua viscosidade. Este fluxo de líquidos em camadas paralelas infinitamente finas que deslizam umas sobre as outras arrastando consigo as camadas adjacentes é chamado de fluxo laminar. Com o tempo as camadas líquidas sofrem deformação e a velocidade com a qual a deformação aumenta em relação ao tempo é chamada de taxa de cisalhamento e a sua unidade é $1/s$. Matematicamente, a taxa de cisalhamento é definida pela velocidade relativa das camadas líquidas dividida pela distância entre elas, indicando a velocidade com que o líquido flui ao se aplicar uma tensão de cisalhamento sobre ele (SCHRAMM, 2006).

Isaac Newton foi o primeiro a estudar as propriedades de fluxo de líquidos de forma quantitativa e, em 1687, apresentou a primeira lei básica da viscosimetria em seu “*Principia*”, onde descreve que “a resistência que deriva da ausência de deslocamento de partes de um líquido é proporcional à velocidade com a qual as partes do líquido são separadas umas das outras” (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989).

A “ausência de deslocamento” descrita por Newton é o que conhecemos atualmente como viscosidade, e significa resistência ao fluxo por parte um líquido quando este encontra-se sob pressão. Quanto maior a viscosidade de um líquido, maior é a força, por unidade de área, necessária para produzir o fluxo deste líquido. Esta força é proporcional ao gradiente de velocidade, ou taxa de cisalhamento, e a fórmula que a descreve é:

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

τ denota a força por unidade de área (F / A), ou tensão de cisalhamento, necessária para provocar um gradiente de velocidade de deslocamento ou taxa de cisalhamento $\dot{\gamma}$ (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989). η representa o coeficiente de viscosidade expressa em Pa.s (Pascal.segundo).

Existem muitas razões para se determinar a viscosidade de materiais. Dentre as mais importantes, primeiro, há a possibilidade de elucidar a estrutura molecular destes materiais a partir de sua viscosidade linear; segundo, os parâmetros e funções medidos em experimentos relevantes podem, algumas vezes, serem úteis no controle de qualidade de produtos (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989).

Líquidos simples podem ser descritos em termos de viscosidade absoluta, contudo, as propriedades reológicas de dispersões heterogêneas são mais complexas e, assim, não podem ser expressas por um único valor (SINKO, P. J., 2008). Sob certas condições de tensão e taxa de cisalhamento, os fluidos não-newtonianos, independentemente do tempo, podem ter um comportamento de fluxo plástico, pseudoplástico ou dilatante, conforme demonstrado na Figura 2.

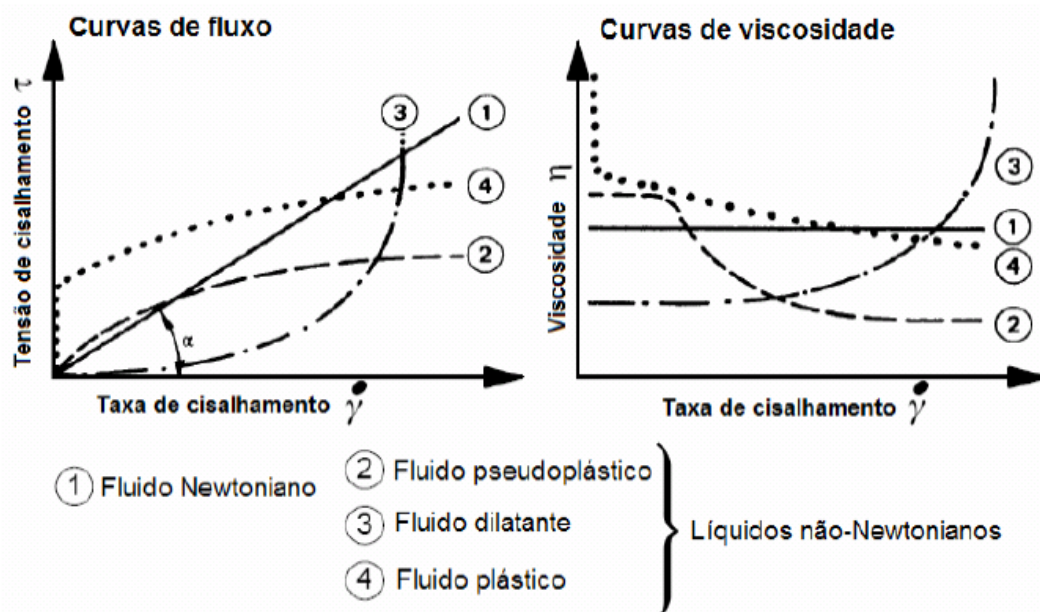


FIGURA 2 - TIPOS DE COMPORTAMENTO DE FLUXO E VISCOSIDADE DE LÍQUIDOS NEWTONIANOS E NÃO – NEWTONIANOS.
FONTE: SCHRAMM (2006).

Para líquidos que exibem um comportamento newtoniano, como a água, por exemplo, a viscosidade é uma constante da relação entre a tensão e a taxa de cisalhamento e, diferentemente dos demais fluidos, não varia com as mudanças na taxa de cisalhamento. Este comportamento pode ser visualizado na figura 2 (1). Para a maioria dos líquidos, ditos não – newtonianos, a viscosidade é uma função desta relação (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989).

Corpos de Bingham são os materiais que apresentam fluxo plástico. De acordo com a figura 2 (4), as curvas do fluxo plástico não interceptam a origem, mas sim o eixo da tensão de cisalhamento em um ponto específico denominado *valor de cedência*. Nos materiais que exibem este tipo de comportamento, o fluxo não inicia até que a tensão de cisalhamento tenha sobrepujado o valor de cedência. Este tipo de fluxo é característico de substâncias que possuem partículas floculadas em suspensões concentradas. O valor de cedência existe em decorrência das forças de van der Waals que mantêm estas partículas em interação. Estas forças devem ser rompidas para que o fluxo possa acontecer. Assim, o valor de cedência é um indicativo da força de floculação. Após sobrepujado o valor de cedência, sistemas

plásticos apresentam um comportamento newtoniano, onde qualquer incremento na tensão resulta em um aumento diretamente proporcional na velocidade de cisalhamento (SINKO, 2008).

Na reologia, substâncias que apresentam comportamento plástico são classificadas como sólidas, enquanto que aquelas que começam a fluir diante de uma mínima força aplicada e não apresentam valor de cedência são classificadas como líquidas (SINKO, 2008).

O fluxo pseudoplástico, presente na maioria e, provavelmente, nos mais importantes fluidos não-newtonianos (CROSS, 1965), é característico de soluções de polímeros. Como pode ser observado na figura 2 (2), a curva representativa de um sistema pseudoplástico não apresenta linearidade, pois a viscosidade destes materiais diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, não podendo ser expressa por um valor único. A diminuição na viscosidade mediante a aplicação de tensões sucessivamente maiores ocorre porque, à medida que a tensão de cisalhamento é aumentada, as moléculas dispersas na solução passam a alinhar seu eixo na direção do fluxo. Tal orientação reduz a resistência interna do material, permitindo assim uma maior velocidade de cisalhamento para cada tensão (SINKO, 2008).

Algumas soluções com elevado teor de sólidos suspensos apresentam aumento da resistência ao fluxo em decorrência do aumento na taxa de cisalhamento. Este tipo de fluxo é o inverso do que ocorre em sistemas pseudoplásticos e deriva da expansão do volume do sistema, por isso são chamados dilatantes. Quando em repouso, materiais que apresentem este tipo de comportamento apresentam as partículas densamente empacotadas, as quais deslocando-se umas sobre as outras mediante fracas tensões de cisalhamento. A quantidade de veículo nesta situação é suficiente para preencher os espaços vazios entre as partículas, permitindo sua movimentação, como um lubrificante. Conforme a tensão é aumentada, ocorre a formação de uma rede frouxa de empacotamento, aumentando o espaço vazio entre as partículas e, conseqüentemente, o volume do material. A partir deste ponto, a quantidade de veículo torna-se insuficiente para preencher o espaço vazio entre as partículas, o que as torna menos lubrificadas e, portanto, menos propensas à movimentação. Dessa forma, o fluxo diminui e a

suspensão se apresentará como uma pasta firme. A partir do momento em que a tensão de cisalhamento é suspensa, o sistema dilatante retorna ao seu estado normal de fluidez, conforme representado na figura 2 (3) (SINKO, 2008).

Fluidos não-Newtonianos cujo comportamento reológico é dependente do tempo de cisalhamento são classificados em tixotrópicos ou reopéticos. No primeiro caso, observa-se uma redução na viscosidade durante o tempo de cisalhamento. Quando o cisalhamento é reduzido gradativamente até a condição inicial, o fluido será menos viscoso ao chegar ao valor mínimo de tensão de cisalhamento. Nos fluidos reopéticos, também conhecidos como anti-tixotrópicos, apresentam o comportamento oposto, a viscosidade aumenta com o tempo de cisalhamento, mesmo a uma velocidade de cisalhamento constante (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SCHRAMM, 2006; SCHOTT, 1992).

As soluções de polissacarídeos geralmente são fluidos não-newtonianos com comportamento pseudoplástico, cujo comportamento aumenta com o aumento da concentração do polímero e diminui com o aumento da temperatura (TONELI; MURR; PARK, 2005).

Embora diferentes soluções de polissacarídeos apresentem diferentes valores de viscosidade, além de diferentes taxas de deformação para a qual a solução começa a escoar, todas apresentam uma forma geral de comportamento pseudoplástico (MORRIS, 1995).

A temperatura tem uma importante influência sobre o comportamento de escoamento de soluções de hidrocolóides. Uma vez que diferentes temperaturas são encontradas durante o processamento de hidrocolóides, suas propriedades reológicas devem ser estudadas também em função da temperatura (TONELI; MURR; PARK, 2005).

2.3.1 Viscoelasticidade

O termo viscoelasticidade denota a existência simultânea de propriedades viscosas (propriedades de um líquido) e elásticas (propriedades de um sólido) em um material. Este tipo de material é chamado semi-sólido, ou viscoelástico. Nos materiais pseudoplásticos estas propriedades coexistem, como possibilidades de resposta às tensões a que possam ser submetidos. O comportamento sólido (distensão) ou líquido (fluxo) vai depender das características relacionadas ao tempo natural de relaxação e ao tempo de duração do experimento (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SCHRAMM, 2006).

Nas soluções poliméricas, como as formadas por polissacarídeos, o comportamento viscoelástico é característico. Este tipo de comportamento pode ser explicado a nível molecular, onde, em seu estado normal, as moléculas flexíveis formadoras do sistema espalham-se em um volume maior que as dimensões de suas unidades repetitivas, mudando continuamente a forma de seu contorno com sua energia térmica. Nestas moléculas, os átomos de carbono que formam a cadeia principal a estruturam em forma de ziguezague, mantendo assim as cadeias num estado mínimo de energia. Uma deformação originada de uma tensão alonga a molécula ou seus segmentos na direção da força aplicada e parte da energia aplicada durante a tensão é armazenada (propriedade de sólidos), enquanto outra parte é dissipada como calor (propriedade de líquidos). O estiramento aumenta os ângulos de ligação e conseqüentemente o estado de energia das moléculas. Quando a força da deformação é retirada as moléculas tentam retornar à conformação inicial e ao estado de menor energia. Em taxas de deformação lentas, entretanto, onde pequenas forças são aplicadas, os sistemas mostram um fluxo com comportamento predominantemente viscoso; a elasticidade não se torna aparente. Isso acontece porque, sob tensões pequenas, as moléculas têm bastante tempo para se arrastar para fora de seu entrelaçamento e fluir lentamente, de forma que seus segmentos não sofrem deformação e, assim, mantêm seus estados de energia mínima (SCHRAMM, 2006).

Para sistemas reais com comportamento viscoelástico o caráter sólido e líquido podem ser quantificados através dos módulos de armazenamento ou elástico, G' , e de perda ou viscoso, G'' , respectivamente, obtidos através de testes dinâmicos. Ambos os módulos são expressos em Pascal (Pa) e são componentes do módulo de cisalhamento complexo (G^*), o qual representa a resistência total à deformação apresentada pela matéria (NAÉ, 1993).

O módulo G' indica que a energia da tensão aplicada é temporariamente estocada durante o experimento e está relacionado com a medida de elasticidade relativa ao caráter sólido do material analisado. Já o módulo G'' , relacionado ao caráter líquido do material, diz respeito ao fato de que a energia aplicada para iniciar o fluxo é irreversivelmente dissipada, sendo convertida em energia térmica (ou calor de cisalhamento) (NAÉ, 1993). O módulo de cisalhamento complexo G^* define a viscosidade dinâmica complexa η^* , através da razão entre G^* e da frequência (f), em Hz. Dessa forma, se uma substância é puramente viscosa, $G' = 0$ e $G^* = G''$; se a substância é puramente elástica, então $G' = G^*$ e $G'' = 0$ (SCHRAMM, 2006).

A variação de G' , G'' e η^* permite caracterizar o comportamento viscoelástico de sistemas de polissacarídeos dentro de uma faixa de viscoelasticidade linear, onde a deformação é proporcional à tensão aplicada e não há alteração da estrutura original da amostra.

Em viscoelasticidade distinguem-se viscoelasticidade linear de não-linear. Na viscoelasticidade linear a deformação sofrida é proporcional à tensão aplicada ao material e não há alteração da estrutura original da amostra. Geralmente as tensões que mantêm as amostras dentro de sua faixa de viscoelasticidade linear são pequenas (SCHRAMM, 2006).

Quando tensões muito maiores são utilizadas, ligações internas temporárias de moléculas e agregados são destruídas, levando a uma perda da viscosidade que resulta em um fluxo irreversível de matéria e perda da energia introduzida sob a forma de calor. Nesta situação, os dados obtidos representam uma viscoelasticidade não linear, pois não são mais uma função do material, mas sim influenciados pelo equipamento e condições de teste e, portanto, não serão reproduzíveis em outro reômetro (SCHRAMM, 2006).

Dada a importância das pectinas na indústria alimentícia, diversos estudos vêm sendo conduzidos ao longo dos anos com o intuito de verificar o comportamento reológico deste polissacarídeo, obtido das mais variadas fontes. Como pectinas são polissacarídeos que formam gel, logo seu comportamento frente à variações de frequência é evidenciado pela estabilidade dos módulos G' e G'' , onde o módulo de armazenamento G' apresenta valores superiores ao módulo de perda, conforme verifica-se em alguns trabalhos sobre o tema (FRAEYE *et al.*, 2009; HAMINIUK *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2010; SENGKHAMPARN *et al.*, 2010; VRIESMANN e PETKOWICZ, 2009; VRIESMANN; AMBONI; PETKOWICZ, 2011).

2.4 *Caryocar brasiliense* Cambess

Caryocar brasiliense Cambess, popularmente conhecido como pequi, pequiá, amêndoa de espinho, grão de cavalo ou amêndoa do Brasil, é uma espécie angiospérmica dicotiledônea pertencente à classe magnoliopsida, ordem malpighiale, família Caryocaraceae (APG II, 2009). Trata-se de uma espécie arbórea, cujas dimensões podem atingir aproximadamente 11m de altura e 83 cm de diâmetro na idade adulta, conforme ilustrado na Figura 3 (EMBRAPA, 2010).

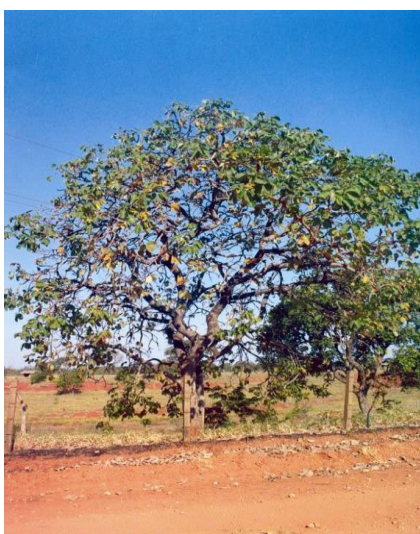


FIGURA 3 - PEQUIZEIRO
FONTE: Embrapa (2010)

No Brasil, cresce naturalmente nas regiões do cerrado, podendo ser encontrada também em algumas regiões da Mata Atlântica e Pantanal. Estende-se por pelo menos sete estados, a maioria localizada na região central e sudeste, entre eles os estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Minas Gerais, Rondônia, Paraná e Bahia (HERINGER, 1960; RIBEIRO, 2000; EMBRAPA, 2010). A distribuição geográfica dos pontos centrais de ocorrência de Pequi está ilustrada na Figura 4.

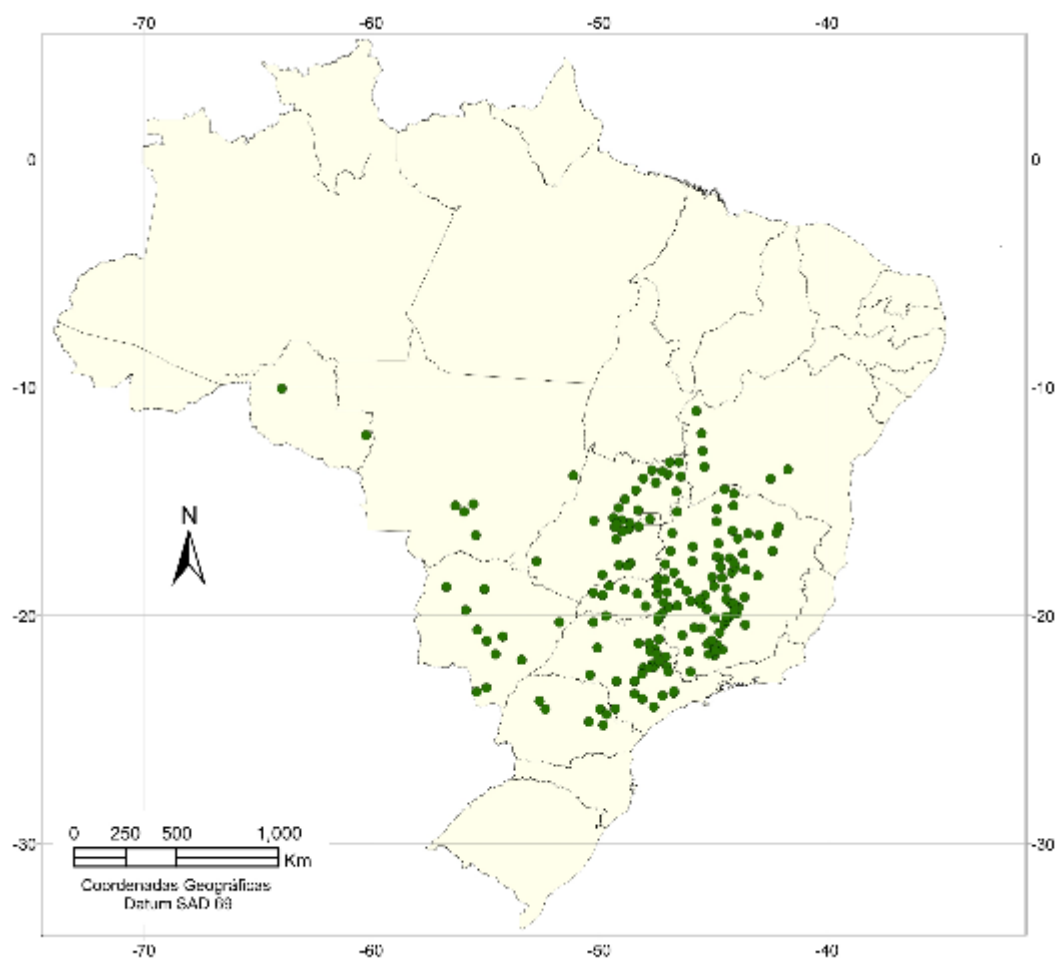


FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS PONTOS DE OCORRÊNCIA NATURAL DE PEQUI
FONTE: Embrapa (2010).

O fruto do pequizeiro, como é conhecida a árvore que o origina, está ilustrado na Figura 5 (A). A polpa possui ampla variedade de aplicações culinárias nas regiões de onde é procedente, compondo pratos como: arroz com pequi, feijão com

pequi, frango com pequi, cuscuz com pequi e o tradicional baião de três (arroz, feijão e pequi). A amêndoa também é utilizada como ingrediente de farofas, doces e paçocas, além de ser consumida salgada como petisco (RIBEIRO, 2000).



FIGURA 5 - PEQUI - (A) CORTE TRANSVERSAL DO FRUTO; B) CORTE TRANSVERSAL DA POLPA CONTENDO A AMÊNDOA.
FONTE: Central do Cerrado, 2008.

A polpa do fruto de pequi é rica em lipídeos e fibra alimentar, os quais constituem 33,4% e 10% do material, respectivamente. Apresenta também um teor de proteínas equivalente a 3% e um aporte energético com cerca de 358 Kcal/100g, o que corresponde a 18% das necessidades calóricas de um adulto em uma dieta de 2.000 Kcal. Na polpa também se detecta a presença de compostos fenólicos e carotenóides totais, os quais estão associados à prevenção de danos provenientes de processos oxidativos (LIMA *et al.*, 2007). Este apreciável valor nutritivo, aliado à facilidade de sua produção e aceitabilidade entre a população torna o pequi uma fonte potencial na alimentação e sobrevivência de uma parcela da população brasileira (RIBEIRO, 2000).

Naves (1999), citado por Vera *et al.* (2007), verificou que, em Goiás, o pequizeiro predomina sobre as demais espécies do cerrado em ocorrência e em frequência. Este fato casa com a popularidade regional do fruto e seu alto consumo pelas populações que habitam as regiões produtoras.

O pequi é um fruto do tipo drupáceo, grande, podendo ultrapassar 10 cm de diâmetro com quatro a seis lóculos (EMBRAPA, 2010). Conforme ilustrado na figura 5(B), é dividido em exocarpo, mesocarpo externo, mesocarpo interno ou polpa,

endocarpo e amêndoa. O mesocarpo interno, juntamente com a amêndoa, compõem a porção comestível do Pequi, representando, respectivamente, apenas 10 e 6% do peso do mesmo. O exocarpo e o mesocarpo externo equivalem ao pericarpo ou casca, uma porção espessa e não comestível que corresponde a aproximadamente 84% do peso do fruto (VERA *et al.*, 2007). O pericarpo é composto por 50,9% de carboidratos totais, sendo que, deste montante, 39,9% correspondem à fibra alimentar. Estes valores de fibra são superiores aos encontrados em alimentos tradicionais como fubá integral (1,2%) e farinha de soja integral (3,3%) (EMBRAPA, 2010; SOUSA *et al.*, 2005).

A casca do fruto possui algumas utilizações populares, entre elas a produção de tintura artesanal (devido ao alto teor de taninos) e suplementação alimentar humana e bovina (EMBRAPA, 2010). Também existem referências quanto ao uso das folhas, flores e frutos do pequi na farmacopéia popular, principalmente o óleo da polpa como expectorante e o chá das folhas como regulador menstrual (FERREIRA *et al.*, 1988). Entretanto, embora estes usos populares sejam reconhecidos, até o presente momento grande parte das cascas é dispensada, não sendo aproveitada comercialmente. Este fato, aliado à elevada proporção da casca em relação à massa total do fruto ocasiona um sério problema ambiental na ocasião de seu descarte em lixo comum (VERA *et al.*, 2007).

Este fato é comprovado pela análise conjuntural da comercialização de pequi pela Central de Abastecimento de Goiás (CEASA-GO), segundo a qual, no ano de 2009 foram comercializadas cerca de 3.875,46 toneladas de pequi no estado (CEASA – GO, 2010). Se 84% do peso do fruto é constituído pela casca, a qual não possui aplicação significativa, logo 84% da quantidade de pequi comercializada é lixo. No caso de Goiás, isto equivale a aproximadamente 3.255,4 toneladas de lixo geradas apenas pelo descarte das cascas do fruto.

Alguns estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de descobrir possíveis utilizações para este material. Marcondes – Nogueira *et al.* (2007) verificaram atividade leishmanicida de extratos aquosos de casca de pequi através de estudos de inibição enzimática da arginase de *Leishmania*; em outro estudo, o extrato da casca apresentou significativa atividade tripanocida, interferindo sobre a parasitemia do *Trypanosoma cruzi* (Herzog – Soares *et al.*, 2002).

Soares Junior *et al.* (2010) desenvolveram uma farinha a partir do mesocarpo externo do pequi, visando uma possível aplicação em indústria de alimentos, e salientaram que, devido ao seu alto conteúdo de fibras e outros carboidratos, o pericarpo poderia ser utilizado pela agroindústria ao invés de descartado.

Ferreira *et. al.* (2005), em resumo publicado nos anais do 9º Congresso Brasileiro de Fruticultura, verificaram a presença de pectina em mesocarpo externo de Pequi e sua utilização na fabricação de geléias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos materiais

Os materiais utilizados nesta pesquisa foram o exocarpo e o mesocarpo externo de frutos maduros de *Caryocar brasiliense* de duas linhagens distintas, diferenciadas visualmente pela cor – a linhagem mais clara e a mais escura. Os frutos de *C. brasiliense* foram coletados de uma população de plantas nativas encontradas no município de Palmas – TO nos meses de novembro e dezembro de 2008. Foram coletados frutos de diversas plantas tomando-se como amostra um *pool* destas.

Após limpeza macroscópica, o exocarpo e o mesocarpo externo foram retirados dos frutos com o auxílio de um estilete e submetidos à secagem e estabilização em estufa a 40°C da marca Quimis, modelo Q-317B-32, até peso constante. Estes procedimentos foram realizados no laboratório de Bioquímica e Química de Carboidratos da Universidade Federal de Tocantins (UFT) e enviados pelo professor Dr. Sergio Donizeti Ascencio ao laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde foram realizados os procedimentos de extração, caracterização química e análises reológicas dos polissacarídeos extraídos das amostras.

Os estudos foram realizados com seis amostras, a saber: exocarpo seco e estabilizado da linhagem mais clara e exocarpo seco e estabilizado da linhagem mais escura de frutos de *Caryocar brasiliense*, os quais foram identificados como **EC** e **EE**, respectivamente; mesocarpo externo da linhagem mais clara – **MC** - e também da linhagem mais escura - **ME**; e exocarpo e mesocarpo externo (juntos, sem separação) das linhagens clara a escura, denominados **PC** e **PE**.

3.2 Extração de polissacarídeos solúveis em água

Na tentativa de obter frações pécticas, empregou-se apenas a água, que, segundo Voragen e colaboradores (1995), solubiliza pectinas altamente esterificadas. Além disso, a água, um extrator natural, pode ser vantajoso para obter pectinas em relação aos métodos convencionais de extração ácida, uma vez que, desta forma, efluentes corrosivos não serão gerados (VRIESMANN, AMBONI, PETKOWICZ, 2011).

Assim sendo, os materiais desidratados e estabilizados foram processados em moinho de facas até obtenção de um farelo e este material bruto foi submetido a sucessivas extrações aquosas, conforme demonstrado na figura 6.

Para as extrações aquosas sob temperatura ambiente, as amostras diluídas permaneceram sob agitação constante em agitador mecânico FISATON 713 *overnight* (aproximadamente 16 h). Nas extrações aquosas a quente, a temperatura adotada foi de 80°C e as amostras permaneceram sob agitação por 3 h.

Após cada extração, as amostras foram centrifugadas em centrífuga HITACHI HIMAC CR 21E (utilizada em todas as etapas de centrifugação) e os resíduos obtidos foram submetidos às extrações subseqüentes. Os extratos obtidos em cada fração foram concentrados em evaporador rotatório, sob temperatura de 40 a 50°C. Após reduzir o volume dos sobrenadantes até um quarto do volume original, os polissacarídeos foram submetidos à precipitação etanólica. Para isto, os concentrados foram adicionados de álcool etílico 95%, grau de pureza PA-ACS, numa proporção de três vezes o seu volume. Após a precipitação, a mistura foi centrifugada. Os precipitados etanólicos foram ressuspensos em água e liofilizados.

As frações polissacarídicas extraídas a temperatura ambiente foram reunidas e seu rendimento em relação ao farelo inicial foi considerado, da mesma forma que para as frações extraídas a quente.

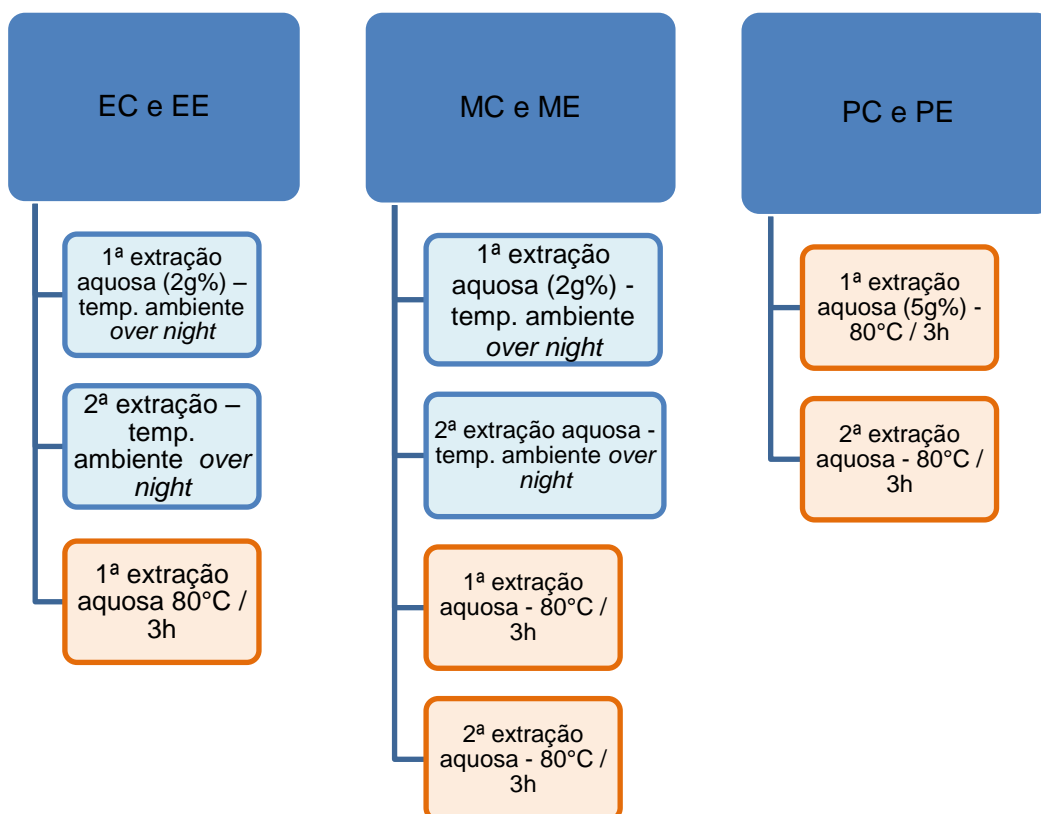


FIGURA 6 - SEQUÊNCIA DE EXTRAÇÕES AQUOSAS REALIZADAS NAS AMOSTRAS RETIRADAS DA CASCA DO PEQUI

3.3 Purificação das amostras

Após a verificação visual de turbidez e partículas em suspensão, as amostras foram solubilizadas em água destilada e submetidas a aquecimento em banho-maria a 50 – 60°C por 1h, com o intuito de se retirar possíveis contaminantes insolúveis que tenham, porventura, permanecido nas frações após a centrifugação. Após este procedimento, resfriou-se imediatamente os reservatórios em água em temperatura ambiente e as soluções foram centrifugadas. O sobrenadante foi liofilizado e seu rendimento calculado.

3.4 Diálise das frações

Após a primeira etapa de purificação – conforme descrito no item 3.3, as amostras liofilizadas foram ressuspensas em água destilada e dialisadas em membranas de celulose com poros de 12 a 14 kDa contra água destilada, originando as frações ECf(d), EC(d), EEf(d), EEq(d), MCf(d), MCq(d), MEf(d), MEq(d), PC(d) e PQ(d), onde “(d)” significa “dialisado”.

Após a primeira diálise, as porções retidas na membrana foram liofilizadas e, após análise em HPSEC-MALLS, RMN e GLC, foram re-suspensas em água ultra pura (oriunda de um sistema de água Milli-Q-Millipore), e dialisadas contra água Milli-Q na expectativa da purificação total da macromolécula, originando as frações ECf(UP), ECq(UP), EEf(UP) e assim sucessivamente.

3.5 Extração de polissacarídeos solúveis para análises reológicas

A extração de polissacarídeos para as análises reológicas foi realizada de forma ligeiramente diferente do até então descrito, conforme se evidencia na figura 7.

Para tanto, utilizou-se do pericarpo da linhagem mais escura do fruto de *Caryocar brasiliense*, do qual se extraiu a fração polissacarídica através de duas extrações sequenciais a temperatura ambiente, seguida de duas extrações sequenciais a 80°C/3h, visando máximo rendimento. Os extratos aquosos de todas as extrações foram reunidos, concentrados em evaporador rotatório e precipitados com etanol 90%, com volume equivalente a três vezes ao da solução de polissacarídeo. Após centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em etanol 70%, centrifugado e ressuspendido em etanol 80%, seguido de etanol 90% e, por fim, em etanol P.A. Após este último processo em etanol absoluto, seguido de centrifugação, o precipitado foi seco em estufa a vácuo e moído em moinho de facas, originando a fração denominada **R**. A fração polissacarídica desta forma obtida foi utilizada nos

experimentos reológicos e submetida às análises químicas, a fim de comparar com as demais frações purificadas para elucidação estrutural.

3.6 Ultra-filtração da amostra R

A amostra R, extraída para reologia conforme descrito em 3.5, foi submetida a um processo de ultra-filtração em sistema para ultra filtração Sartorius 16249 (Goettingen, Alemanha) sob pressão em atmosfera de nitrogênio. Este processo foi testado nesta amostra para se verificar sua efetividade no processo de purificação. 100 mg de amostra foram solubilizados em água destilada na proporção de 2 mg/mL e esta solução foi submetida à filtração em membranas de nitrocelulose Millipore®, primeiramente em 1000 kDa (0,05 μ m). A fração retida foi retirada, ressuspensa em água e liofilizada, gerando a fração R1000, enquanto o eluído foi submetido à nova filtração em membrana de 500 kDa (0,025 μ m) gerando a fração R500. O eluído desta filtração foi então filtrado em membrana de 300 kDa, originando as frações R300 e E300, retido e eluído, respectivamente, os quais foram liofilizados.

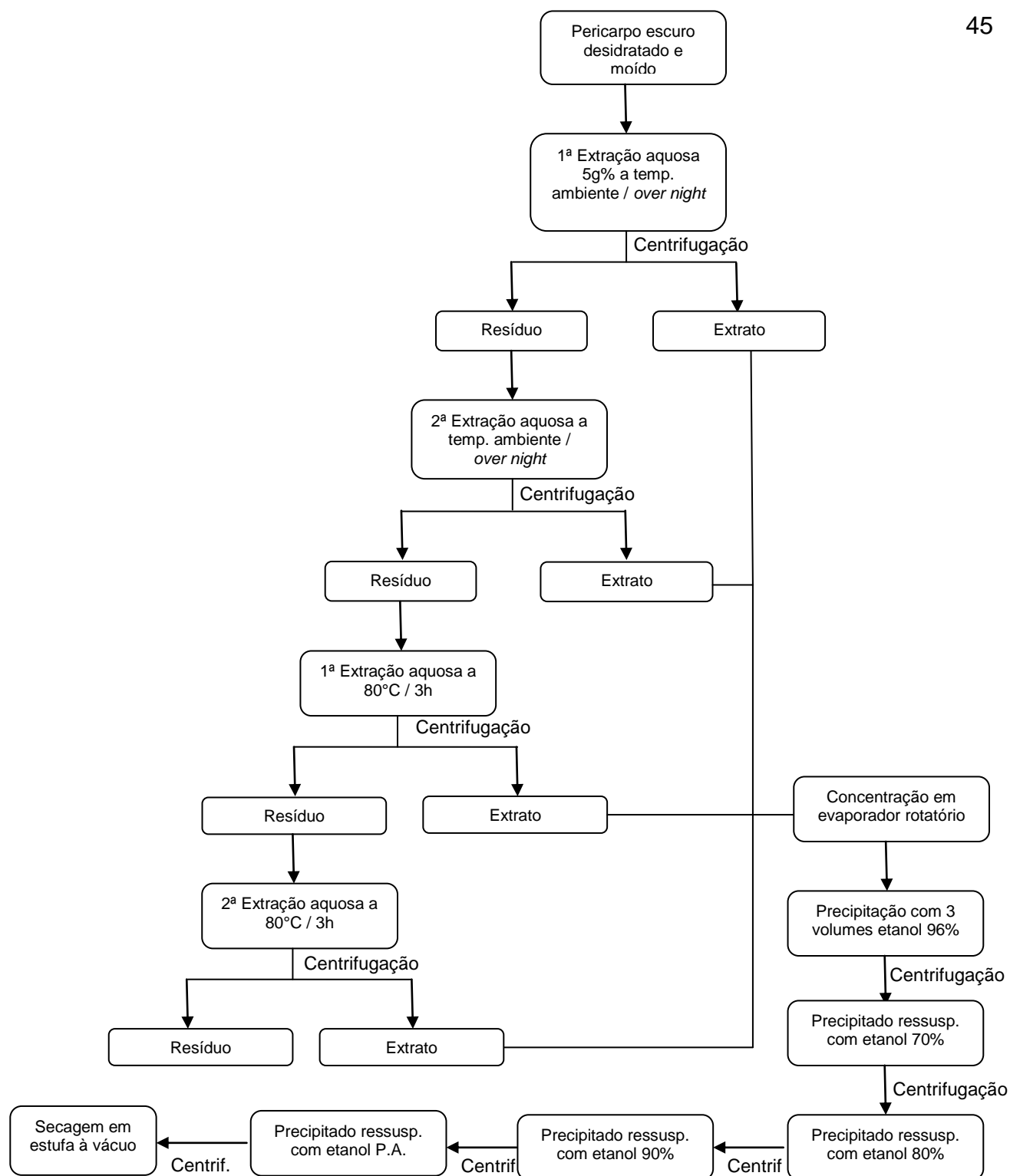


FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO R DO PERICARPO PARA ANÁLISES REOLÓGICAS

3.7 Dosagens colorimétricas

Todas as análises colorimétricas foram realizadas em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC.

3.7.1 Dosagem de carboidratos totais

A quantificação dos carboidratos totais presentes em cada fração foi realizada segundo o método desenvolvido por Dubois e colaboradores (1956).

A dosagem de açúcares totais de cada amostra foi realizada com diferentes padrões, de acordo com o teor de ácidos urônicos de cada uma. Assim, para as amostras com teor de ácidos urônicos próximo a 50%, utilizou-se um padrão de ácido galacturônico misturado à arabinose na proporção de 1:1. Para as amostras com teores de ácidos urônicos de 60 a 80% utilizou-se padrão de ácido galacturônico e arabinose na proporção de três partes de ácido galacturônico (1mg/mL) para uma de arabinose (1mg/mL) e para as amostras que apresentaram teores de urônicos acima de 80% foi utilizado um padrão somente com ácido galacturônico. Utilizaram-se concentrações variando de 20 - 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.7.2 Determinação do teor de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada através do método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão e procedendo-se a leitura a 280 nm. O método baseia-se no princípio da formação de um complexo pela ligação entre o corante (Coomasie Brilliant Blue G250) e a proteína.

3.7.3 Dosagens de ácidos urônicos

A determinação do teor de ácidos urônicos presente em cada fração foi realizada pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), utilizando como solução padrão ácido galacturônico nas concentrações de 20 - 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e leitura em 525 nm.

3.8 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de foram obtidos em espectrômetro da marca BRUKER, série Avance, modelo DRX 400.

3.8.1 Ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN- ^{13}C)

As frações polissacarídicas obtidas foram neutralizadas com NaOH, devido ao seu pH ácido, liofilizadas e então solubilizadas em água deuterada (99,8 % de pureza) na concentração de 30-40 mg/mL. Transferiu-se as amostras solubilizadas para tubos de 5 mm de diâmetro e estas foram analisadas à temperatura de 70°C. Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C foram obtidos na frequência base de 100 MHz e os deslocamentos químicos foram expressos em relação ao deslocamento químico da acetona (30,2 ppm)

3.8.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN- ^1H)

Para a obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H) foi necessário que os hidrogênios hidroxílicos das unidades monossacarídicas fossem trocados por deutério. Para isso as amostras passaram por três ciclos de troca, cada um consistindo de solubilização da amostra em D_2O (99,8 % de pureza) e liofilização. Após a última troca as amostras foram novamente ressolubilizadas em água deuterada a 10 mg.mL^{-1} e transferidas para tubos de 5 mm.

Os espectros de RMN- ^1H foram obtidos em frequência de 400,13 MHz e a temperatura de análise foi de 70°C . Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm utilizando a água como padrão interno (4,2 ppm).

3.8.2.1 Determinação do grau de acetilação (DA) e metoxilação (DM) por RMN de ^1H

O grau de acetilação e metoxilação das frações pécticas foi determinado a partir de RMN de ^1H conforme os métodos desenvolvidos por Bédouet, Courtois e Courtois (2003) e Rosenbhom *et al.* (2003), respectivamente.

As amostras foram solubilizadas em D_2O , congeladas e liofilizadas, processo que foi repetido três vezes em cada amostra, de modo que os hidrogênios das hidroxilas fossem trocados por deutério. Após este procedimento, as frações foram re-suspendidas em D_2O a 10 mg/mL e uma alíquota de $500 \mu\text{L}$ foi transferida para um tubo de 5 mm. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios foram determinados utilizando-se as seqüências de pulsos convencionais providas pelo equipamento, com 16 scans para cada experimento.

Após realizar a primeira análise a 80°C , adicionou-se aos tubos $55 \mu\text{L}$ de NaOD 1M para promover a saponificação da amostra e conseqüente liberação dos grupos metil e acetil sob a forma de metanol e acetato de sódio, respectivamente.

A determinação do DM foi realizada a partir da relação das integrais dos picos dos H-5 das unidades esterificadas e não esterificadas no material nativo (ROSENBOHM *et al.*, 2003). A determinação do DA realizou-se a partir da integração da área do pico relativo ao grupo acetil em relação à área do pico do H-4 do ácido galacturônico nas amostras saponificadas (BÉDOUET; COURTOIS E COURTOIS, 2003). Os limites das integrais foram definidos manualmente para cada espectro, de acordo com sua aparência.

Mesmo quando se seca cuidadosamente a pectina e procede-se de forma a trocar hidrogênios por deutério, um resquício de água permanece e, portanto, o pico a ela relacionado não pode ser totalmente evitado. Deste modo, utilizou-se a água como padrão interno, cujo deslocamento químico encontra-se em 4,20 ppm na temperatura de 70° C (Rosenbhoum *et al.*, 2003)

O padrão de pectina de maçã Sigma – Aldrich (código 76282) com DE de 70-75% foi também avaliado para validação dos métodos. O DA não foi informado nas especificações do produto.

3.9 Análise da Composição Monossacarídica

3.9.1 Hidrólise ácida

3.9.1.1 Curva de hidrólise

A fração polissacarídica extraída do pericarpo escuro, PEq, foi escolhida como representante das demais frações e submetida a uma curva de hidrólise para se determinar as melhores condições de concentração de ácido e tempo de exposição na hidrólise total.

Para isto a amostra foi solubilizada em ácido trifluoroacético (TFA) 1 M e 2 M na concentração de 4 mg/mL (p/v). Após completa dissolução, as soluções foram distribuídas em *vials* e então submetidas à temperatura de 100° C durante os

tempos de 2, 4, 6 e 8 h para as amostras diluídas em TFA 1 M e 1, 2, 3, 4 e 6 h para as amostras dissolvidas em TFA 2M.

Após este processo o ácido foi evaporado sob corrente de ar em capela e as amostras secas analisadas quanto ao teor de açúcares totais pelo método de Dubois *et al.* (1956), e açúcares redutores pelo método do DNS (MILLER, 1956), utilizando Arabinose:ácido galacturônico (1:1) como padrão em ambas as dosagens.

3.9.2 Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise.

Os produtos de hidrólise foram reduzidos com borohidreto de sódio (NaBH_4) por 12 h à temperatura ambiente e, em seguida, neutralizados com ácido acético diluído até pH 5. O material foi seco em atmosfera de nitrogênio e então submetido a co-distilação com metanol, de três a quatro vezes. A acetilação dos alditóis conduziu-se com 0,5 mL de anidrido acético por 1h a 120°C e os acetatos de alditóis obtidos foram analisados por GC – MS.

3.9.3 Carboxi – redução das frações polissacarídicas

A fração escolhida para ser submetida à carboxi-redução foi a R, por se tratar da fração a ser empregada nas análises reológicas e, portanto, a que necessitou de maiores esclarecimentos quanto à sua estrutura química.

Os grupos carboxílicos das unidades de ácidos urônicos foram reduzidos às suas correspondentes unidades neutras pelo método de Stone e Anderson (1985), uma variação do método de Taylor de Conrad (1972). Este método é utilizado para preparar deuterohexoses a partir de ácidos hexaurônicos em polissacarídeos pécnicos prioritariamente à determinação quantitativa e identificação de acetatos de alditóis por GC-MS, possibilitando, assim, a determinação do tipo e quantidade do ácido urônico constituinte do polissacarídeo (STONE; ANDERSON, 1985).

Carbodiimidas solúveis em água reagem prontamente com polissacarídeos ácidos, formando intermediários altamente susceptíveis à nucleófilos. Tais intermediários, ou os produtos de sua reação com grupos hidroxil nucleofílicos, são rapidamente reduzidos por Borohidreto de sódio, NaBH_4 (STONE; ANDERSON, 1985). De modo a permitir a reação com a carbodiimida, previamente à carboxi-redução as amostras foram saponificadas para liberação dos ésteres de metil dos grupos carboxílicos dos ácidos urônicos. Neste processo a fração polissacarídica (6 mg/mL) foi solubilizada em NaOH 0,06M sob agitação constante durante 1h30min. O sucesso do procedimento foi acompanhado por RMN de ^{13}C e RMN de ^1H .

3.10 Análises Cromatográficas

3.10.1 Cromatografia Líquido-Gasosa

Os acetatos de alditóis formados conforme descrito em 5.7.2 foram analisados em cromatógrafo THERMO Trace GC Ultra, com detector de ionização de chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste em fluxo de $2,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m X 0,25 mm d.i.), sendo a temperatura do detector 300°C e a do injetor 250°C .

3.10.2 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS)

A determinação da composição monossacarídica e quantificação de acetatos de alditóis parcialmente metilados foi realizada através da comparação entre o tempo de retenção e os perfis de fragmentação por impacto de elétrons característicos das amostras e dos padrões ribose, arabinose, xilose, manose, galactose, ramnose, fucose e glucose (SLONEKER, 1972; JANSON *et al.*, 1976; SASSAKI *et al.*, 2005).

Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados em cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3800, acoplado a um espectrômetro de massas SATURN 200 R, modelo ITD 800 equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225, marca J.W. Utilizou-se hélio como gás de arraste (1 ml.min^{-1}), temperatura de injeção de 50°C e rampa de temperatura de $50^\circ\text{C} / \text{min}$, a qual foi programada para atingir até 220°C (temperatura constante). As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, repetindo-se a cada 1/8 de segundo, e com relação massa/carga (m/z) entre 90 a 220.

3.10.3 Cromatografia de exclusão estérica de alto rendimento (HPSEC-MALLS-RID)

Para as análises de homogeneidade dos extratos obtidos utilizou-se o cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com um detector de índice de refração diferencial (RID) WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS). Utilizou-se 4 colunas de gel permeação Waters em série, com limites de exclusão de 7.106, 4.105, 8.104 e 5.103 g.mol^{-1} . As análises foram efetuadas a 25°C utilizando como eluente solução de NaNO_2 0,1 mol.L^{-1} contendo NaN_3 200 ppm, com fluxo de 0,6 mL.min^{-1} , monitorado através de bomba peristáltica Waters 515. As amostras foram preparadas em soluções de 1 mg/mL em nitrito de sódio (NaNO_2 0,1 M) e azida de sódio (200 ppm) dissolvidas em água MilliQ, previamente filtradas em membranas Millipore (acetato de celulose) de 0,22 μm . A fase móvel utilizada foi nitrito de sódio (NaNO_2 0,1 M) e azida de sódio (200 ppm) e a análise foi realizada em fluxo de 0,6 mL/min . Os dados foram analisados através do programa ASTRA (WAYTT TECHNOLOGY).

3.11 Análises Reológicas

As análises reológicas foram realizadas com o objetivo de avaliar o comportamento das frações pécticas em meio salino e em presença de sacarose. Para tanto foram realizadas curvas de fluxo, viscosidade, varredura de frequência e rampas de temperatura, em triplicatas.

Conduziu-se os experimentos em Reômetro Haake Mars acoplado a um banho termoestabilizado Haake K15, a um termocirculador de água DC5 e a um controlador térmico TC 81 (Peltier), utilizando o sensor cone-placa C60 2Ti (raio $R = 30$ cm, ângulo $b = 2^\circ$, fenda $h = 0,105$ mm e volume 2 cm^3). As amostras foram carregadas no sensor com o auxílio de uma colher plástica. Os dados coletados foram analisados pelo software RHEOWIN 3.

Previamente às análises foi determinada a inércia do equipamento para descontar os valores das forças centrífuga e centrípeta geradas durante os experimentos.

3.11.1 Preparo da amostra para análises reológicas

A amostra R (item 3.5) foi solubilizada em água destilada, sobre agitador magnético, nas concentrações de 10, 25, 35 e 50g/L para a realização de curvas de fluxo e viscosidade. Nestas concentrações também foi testado o efeito da adição de NaCl (0,2 e 0,4 M) e sacarose (50, 60 e 70%, p/p) no comportamento reológico das amostras.

A adição de NaCl em ambas as concentrações foi feita através da completa solubilização do polissacarídeo na solução salina (0,2 e 0,4 M), sob agitação magnética.

Para a adição de sacarose, previamente solubilizou-se o polissacarídeo em água destilada *over night*, nas devidas concentrações. A proporção de 50, 60 e 70% (p/p) de sacarose foi calculada em relação ao peso da solução após completa dissolução do polissacarídeo. A quantidade necessária de sacarose foi adicionada

sob agitação constante e, após dissolução completa desta, a mistura foi aquecida a 95°C por 15 min e resfriada em temperatura ambiente. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento da análise por, no mínimo, 2 h.

Para as varreduras de tensão e varreduras de frequência utilizou-se o polissacarídeo na concentração de 35 g/L, solubilizado em água e em solução de NaCl 0,2 e 0,4 M, bem como adicionado de 50, 60 e 70% de sacarose. Nestas análises também foi avaliado o comportamento das amostras nas concentrações de 10, 25 e 35g/L acrescidas de 50% de sacarose.

3.11.2 Curvas de fluxo

Em um fluido Newtoniano a viscosidade é dita Viscosidade Newtoniana. No caso de fluidos não newtonianos, entretanto, a razão $\tau / \dot{\gamma}$ não é constante, então a viscosidade é dita aparente e é dependente da taxa de cisalhamento. Esta dependência é representada nas curvas de fluxo (MALKIN, 1994).

Todas as amostras foram submetidas às curvas de fluxo no modo CS, para as quais a taxa de cisalhamento variou de 0,01 a 100 s⁻¹.

Para a análise dos dados foi utilizado o modelo reológico de Herschel-Bulkley e o parâmetro estatístico utilizado para medir o grau de correlação entre os dados experimentais e os dados previstos por este modelo foi o coeficiente de determinação R^2 . Quando $R^2 = 1$ esta correlação é perfeita; se $R^2 = 0$ existe uma variação grande na estimativa da variável dependente y e a correlação é baixa. O modelo de Herschel-Bulkley foi o que apresentou maior valor de R^2 e, portanto, foi escolhido por apresentar a melhor correlação dos pontos experimentais com a curva prevista pelo modelo (STEFFE, 1996).

3.11.3 Varredura de Tensão

As varreduras de tensão foram realizadas previamente às varreduras de frequência com o intuito de se determinar a faixa de viscoelasticidade linear das amostras, onde a deformação é proporcional à tensão aplicada e não há alteração da estrutura original da amostra (SCHRAMM, 2006). Este teste foi realizado com a frequência fixada em 1 Hz, uma vez que a faixa de viscoelasticidade linear é dependente da frequência.

A região viscoelástica linear foi determinada pela faixa de amplitude para qual G^* e δ permaneceram constantes.

3.11.4 Varredura de Frequência

Nos experimentos de varredura de frequência, a frequência variou de 0,01 a 100 Hz, em uma tensão constante de 2 Pa, que está dentro da RVL (região viscoelástica linear). Os testes geraram os módulos elástico G' , viscoso G'' e a viscosidade complexa η^* , tornando possível comparar o perfil viscoelástico característico dos sistemas formados pelos polissacarídeos da casca de *Caryocar brasiliense*.

3.11.5 Análises dinâmicas termomecânicas

As amostras 35 g/L, 35 g/L + NaCl 0,2M e 35 g/L + Sacarose 50% foram avaliadas em rampas de temperatura. Seu comportamento frente a variações de temperatura foi realizado em um programa de aquecimento de $2^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, em temperaturas crescentes de 5 a 95°C , seguida de resfriamento de $95-5^{\circ}\text{C}$, em frequência fixa de 1 Hz e tensão de 2 Pa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química das frações polissacarídicas obtidas da casca de Pequi

A partir das extrações aquosas das diferentes porções do fruto de *Caryocar* brasiliense, tem-se, conforme descrito na tabela 2, os seguintes rendimentos em relação à massa seca da matéria-prima, em g/%:

TABELA 2 - RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS APÓS EXTRAÇÃO E DIÁLISES

Material	Amostra	Rendimento após extração (%)	Rendimento após purificação* (%)	Rendimento após diálise** (%)	Após diálise contra H ₂ O ultra pura*** (%)
Exocarpo claro	ECf	11,6	81	55	75
	ECq	2,1	81	68	80
Exocarpo escuro	EEf	12,3	87	59	84
	EEq	2,5	85	77	86
Mesocarpo claro	MCf	6,9	91	40	91
	MCq	4,2	82	72	100
Mesocarpo escuro	MEf	9,7	79	50	92
	MEq	3,1	83	73	98
Pericarpo claro	PCq	11,7	87	44	95
Pericarpo escuro	PEq	12,5	82	57	94
Pericarpo escuro (reologia)	R	14	-	-	-

*Em relação à fração após a extração

** Em relação à fração após purificação

*** Em relação à fração após diálise

É possível verificar a partir da Tabela 2 que os maiores rendimentos foram obtidos com as extrações aquosas a frio, embora rendimentos semelhantes tenham sido obtidos nas frações oriundas do pericarpo, extraídas diretamente a quente. Isto demonstra que a temperatura não teve importância no processo e sim a ordem de extração, já que as primeiras extrações obtiveram melhores resultados em termos de rendimento.

Observa-se também que as frações de maior rendimento após a extração foram: ECf, EEf, PCq, PEq e R. Todas foram extraídas de materiais que continham exocarpo, indicando que, possivelmente, esta porção do fruto seja mais rica em polissacarídeos solúveis em água em relação ao mesocarpo ou que, por outro lado, nesta porção os polissacarídeos estejam mais susceptíveis à extração.

Estes rendimentos foram ligeiramente mais baixos em comparação ao do extrato aquoso (a 75°C / 1h) obtido de cascas de frutos de Ambarella (*Spondias cytherea*) (KOUBALA *et al.*, 2008) e cascas de cacau (*Theobroma cacao* L.) extraídos a 100°C / 90 min (VRIESMANN; AMBONI; PETKOWICZ, 2011) e mais altos quando comparados ao extrato de cascas de limão (*Citrus latifolia*) (KOUBALA *et al.*, 2008) e cascas de cacau (*Theobroma cacao* L.) extraídos a 50°C / 90 min (VRIESMANN; AMBONI; PETKOWICZ, 2011), bem como para o extrato aquoso de polpa de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) a 25°C / 90 min (VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2009).

Após a etapa de diálise contra água mili-Q, mais de 80% do material inicial permaneceu retido na membrana, dados consistentes com os encontrados por SINGTHONG *et al.* (2005) para pectinas de folhas Krueo Ma Noy, uma espécie de trepadeira lenhosa típica da Ásia e África. O rendimento final de polissacarídeo em relação ao extrato inicial foi relativamente baixo considerando o peso real do polissacarídeo e, por isso, os processos de purificação e diálises não foram realizados para a amostra a ser utilizada nas análises reológicas.

Nas tabelas 3 e 4 são descritos os teores de açúcares totais, ácidos urônicos e proteínas das frações polissacarídicas obtidas após as extrações e diálises.

TABELA 3 - TEORES DE AÇÚCARES TOTAIS, ÁCIDOS URÔNICOS E PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS EXTRAÍDAS DOS EXOCARPOS CLARO E ESCURO

Material	Amostra	Açúcares totais (%) ^a	Ácidos urônicos ^b (%) [*]	Proteínas (%) ^c
Exocarpo claro extraído a frio	ECf	74 ^d	56	nd
	ECf(d)	94 ^d	89	nd
	ECf(UP)	89 ^e	91	nd
Exocarpo claro extraído a quente	ECq	102 ^d	33	nd
	ECq(d)	83 ^f	83	nd
	ECq(UP)	76 ^e	84	nd
Exocarpo escuro extraído a frio	EEf	85 ^d	46	nd
	EEf(d)	101 ^d	49	nd
	EEf(UP)	63 ^e	82	nd
Exocarpo escuro extraído a quente	EEq	101 ^d	49	nd
	EEq(d)	83 ^f	60	nd
	EEq(UP)	76 ^e	62	nd

a, b, c = Determinado pelos métodos: DUBOIS et al. (1956); FILIZETTI-COZZI e CARPITA (1991) e BRADFORD (1976) respectivamente.

* Expresso em percentagem em relação ao teor de açúcares totais. ^dDosagens realizadas com padrão de ácido galacturônico. ^eDosagem realizada com padrão de ácido galacturônico:arabinose (1:2). ^fDosagem realizada com padrão de ácido galacturônico:arabinose (1:1).

nd – não detectado pelo método.

TABELA 4 - TEORES DE AÇÚCARES TOTAIS, ÁCIDOS URÔNICOS E PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS EXTRAÍDAS DOS MESOCARPOS E PERICARPOS CLARO E ESCURO

Material	Amostra	Açúcares totais (%) ^a	Ácidos urônicos ^b (%) [*]	Proteínas (%) ^c
Mesocarpo claro extraído a frio	MCf	91 ^d	55	nd
	MCf(d)	81 ^f	69	nd
	MCf(UP)	69 ^e	87	nd
Mesocarpo claro extraído a quente	MCq	113 ^f	49	nd
	MCq(d)	84 ^e	47	nd
	MCq(UP)	84 ^e	53	nd
Mesocarpo escuro extraído a frio	MEf	105 ^d	25	nd
	MEf(d)	68 ^f	92	nd
	MEf(UP)	66 ^e	91	nd
Mesocarpo escuro extraído a quente	MEq	121 ^f	42	nd
	MEq(d)	93 ^f	80	nd
	MEq(UP)	65 ^e	37	nd
Pericarpo claro extraído a quente	PCq	89 ^d	19	3,2
	PCq(d)	74 ^f	66	3,2
	PCq(UP)	67 ^e	77	3,2
Pericarpo escuro extraído a quente	PEq	95 ^d	48	3,9
	PEq(d)	90 ^f	93	3,9
	PEq(UP)	80 ^e	72	3,9
Pericarpo escuro extraído a quente (reologia)	R	57,2 ^e	58	3,9

a, b, c = Determinado pelos métodos: DUBOIS et al. (1956); FILIZETTI-COZZI e CARPITA (1991) e BRADFORD (1976) respectivamente.

* Expresso em percentagem em relação ao teor de açúcares totais. ^dDosagens realizadas com padrão de ácido galacturônico. ^eDosagem realizada com padrão de ácido galacturônico:arabinose (1:2). ^fDosagem realizada com padrão de ácido galacturônico:arabinose (1:1).

nd – não detectado pelo método

Todas as frações apresentaram alta concentração de carboidratos totais e ácidos urônicos e estes últimos aumentaram gradualmente após a diálise. Frações pécicas são geralmente caracterizadas pela presença predominante de ácido galacturônico por ser este o constituinte da cadeia principal (HOUBEN *et al.*, 2011; VORAGEN *et al.*, 1995). Sendo assim, um teor elevado de ácidos urônicos é

consistente com a presença de pectinas nas amostras e o aumento de sua concentração ao longo das diálises nos leva a crer que houve um aumento na concentração do polissacarídeo em questão.

Os teores de urônicos encontrados em todas as amostras foram muito superiores aos encontrados por Houben *et al.* (2011) para frações aquosas de polissacarídeos oriundos de brócolis (*Brassica oleracea* cv. Italica), cenoura (*Daucus carota* cv. Nerac) e tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Heinz), bem como para frações de cascas de Ambarella (*Spondias cytherea*) e cascas de limão (*Citrus latifolia*) (KOUBALA *et al.*, 2008). Semelhante a estes resultados foram os encontrados por Vriesmann *et al.* (2011) para cascas de Cacau e Vriesmann e Petkowic (2009) para polpa de Cupuaçu.

Devido à existência destes teores elevados de ácidos urônicos em todas as frações analisadas e, após a realização de uma cromatografia em camada delgada – TLC, verificando a presença de ácido galacturônico (GalA) ao invés de ácido glucurônico (GluA) (dados não demonstrados), foi selecionado como padrão o GalA para a dosagem de carboidratos totais. Este fato, entretanto, levou à superestimação do teor de carboidratos totais e fez com que as amostras ECq, EEq, MCq, MEf e MEq apresentassem rendimentos de açúcares totais maiores do que 100%. Este fenômeno pode ser explicado ao se observar a curva padrão obtida com ácido galacturônico e comparada com as misturas dos padrões testados no presente trabalho (Figura 8).

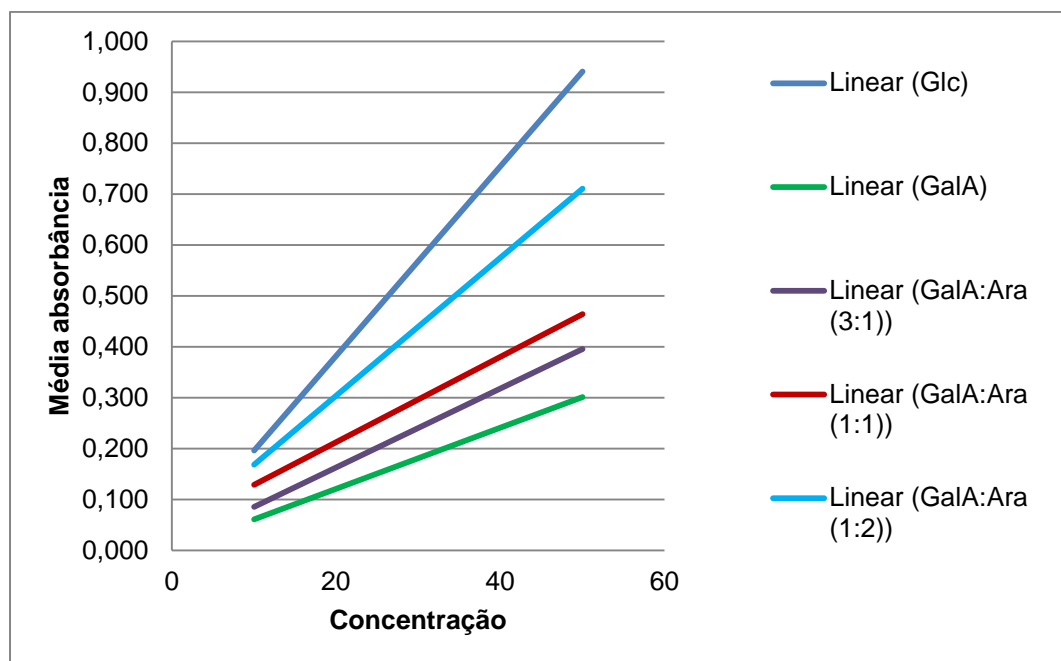


FIGURA 8 - PADRÃO PARA DOSAGENS DE CARBOIDRATOS TOTAIS

Dado um menor ângulo de inclinação da curva obtida com o padrão de ácido galacturônico em relação às obtidas com açúcares neutros, obtém-se na equação da reta $y=ax + b$, um valor de a menor para as curvas de ácido galacturônico. Sendo assim, o resultado final é consideravelmente maior quando se utiliza a curva padrão com este monossacarídeo (DUBOIS *et al.*, 1956). Para corrigir a determinação, utilizou-se uma mistura de padrões de ácido galacturônico e arabinose (outro monossacarídeo presente em abundância nas frações, conforme descrito no item 6.3, adiante), o que levou à uma melhor estimativa dos teores de açúcares totais nas amostras.

A porcentagem de carboidratos totais encontrados neste trabalho foram superiores em relação aos 55% encontrados por Vriesmann e colaboradores (2011) e Singthong e colaboradores (2005) para extratos de cascas de cacau e folhas de Krueo Ma noy, respectivamente. Esta comparação, entretanto, não pode ser levada em consideração, uma vez que estes autores utilizaram padrão de glicose para a determinação de carboidratos totais. A porcentagem de carboidratos das amostras foram equiparáveis aos encontrados por Tamaki *et al.* (2008) para extratos ácidos do endocarpo de *Citrus depressa*, os quais utilizaram igualmente padrão de ácido galacturônico, da mesma forma que no presente trabalho.

A amostra extraída para reologia e não submetida à ultra-filtração ou diálise, apresentou menor teor de açúcares totais em relação às demais amostras.

As frações polissacarídicas extraídas apresentaram uma baixa percentagem de proteínas.

4.1.1 Composição Monossacarídica

Polissacarídeos pécticos são caracterizados pela presença predominante de ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose, estes últimos constituintes das ramificações das cadeias de galacturonana. De acordo com a fonte e com as condições aplicadas durante seu isolamento e purificação, a composição das pectinas pode variar e, a partir desta variação, diferentes tipos de polissacarídeos pécticos podem ser identificados (ROLIN, 1993; VORAGEN *et al.*, 1995).

Previamente à hidrólise do polissacarídeo para determinação da composição monossacarídica foi realizada uma curva de hidrólise com a fração extraída do pericarpo escuro, PEq, de forma a se determinar a melhor condição para liberação dos monossacarídeos, conforme descrito nos materiais e métodos no item 3.9.1.1.

Nas Figuras 9 e 10 são ilustradas as curvas de hidrólise da amostra em ácido trifluoroacético (TFA) 1 M e 2 M, respectivamente.

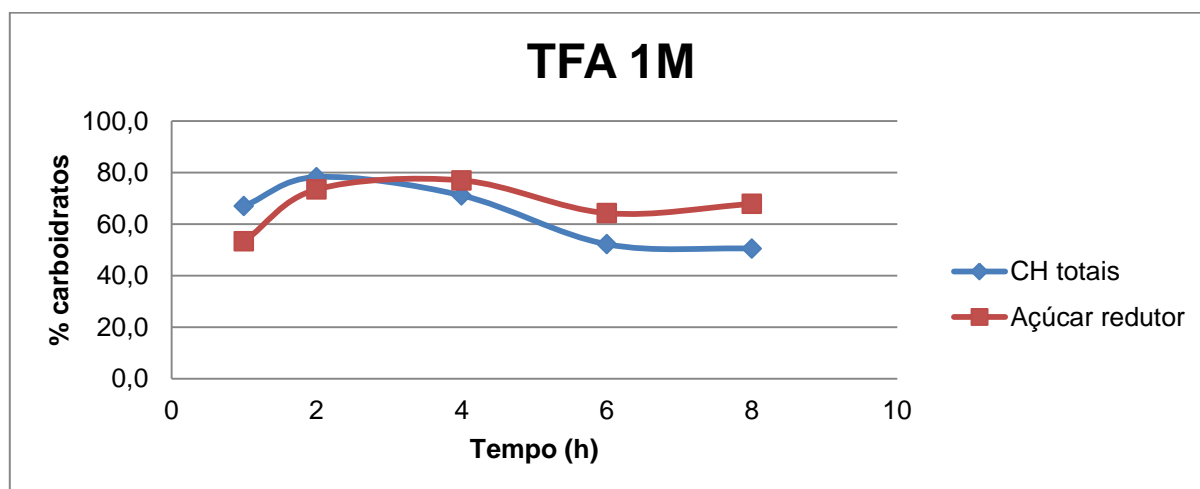


FIGURA 9 - CURVA DE HIDRÓLISE DA AMOSTRA PEq EM TFA 1 M

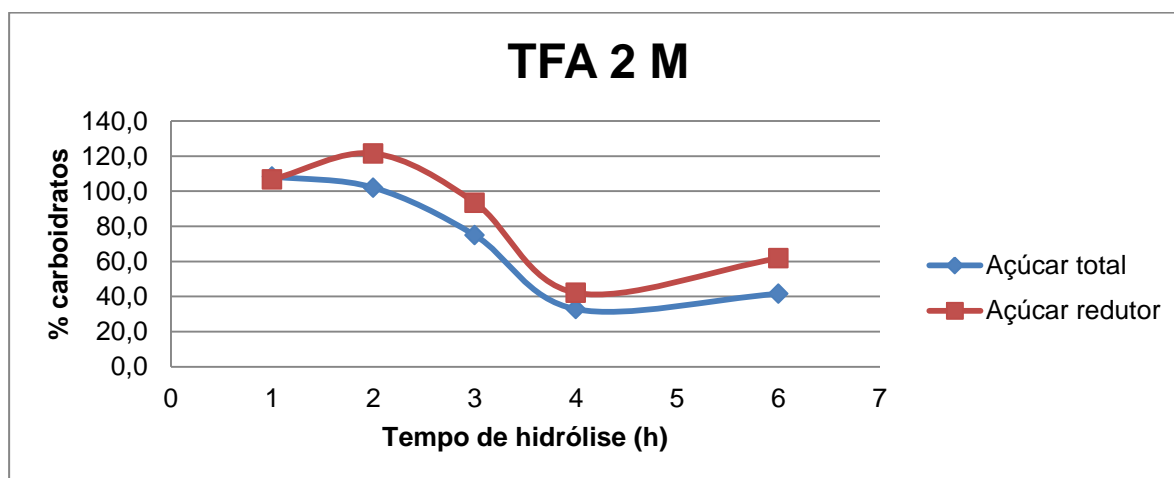


FIGURA 10 - CURVA DE HIDRÓLISE DA AMOSTRA PEq EM TFA 2 M

O método do DNS determina a percentagem de açúcares redutores através da oxidação do grupo aldeído da molécula de açúcar a ácido carboxílico e redução do reagente 3,5-di-nitrosalicilato (de cor amarela forte) a 3-amino-5-nitro-salicilato, em proporções estequiométricas (MILLER, 1956). Um açúcar redutor é um açúcar no qual o carbono anomérico não está envolvido em uma ligação glicosídica e, portanto, pode sofrer oxidação. Todos os monossacarídeos são potencialmente redutores, devido à presença da carbonila. Outros carboidratos necessitam serem hidrolisados para se tornarem redutores (LEHNINGER, 2006).

Considera-se a melhor condição de hidrólise aquela onde o teor de açúcares totais é equivalente ao teor de açúcares redutores, o que significa que todo o açúcar da amostra está presente na forma de monossacarídeos livres. Conforme pode-se observar no gráfico da Figura 9, esta condição é melhor alcançada com a amostra solubilizada em TFA 1 M em 3 h a 100°C, pois as curvas referentes ao teor de carboidratos totais e açúcares neutros se cruzam no gráfico, indicando que a percentagem de açúcares redutores é a mesma que a de carboidratos totais, ou seja, todos os carboidratos estão sob a forma monossacarídica. A partir de 4h sob temperatura e em meio ácido, verifica-se uma redução no teor de carboidratos totais, indicando que parte destes foi degradada, dadas as drásticas condições à qual foram submetidos. Com a utilização de TFA 2 M esta degradação começou a partir

de 1 h de hidrólise, demonstrando a labilidade da amostra nestas condições e a alta probabilidade de se ocorrer degradação dos açúcares ao se utilizar esta concentração de ácido. Portanto, esta concentração foi descartada e as hidrólises das demais frações para a composição monossacarídica foram realizadas com TFA 1M a 100°C por 3h.

Nas tabelas 5 e 6 são descritas as composições de monossacarídeos das frações extraídas da casca de Pequi.

A composição monossacarídica das frações apresentou, além da presença majoritária de ácido galacturônico em todas as frações, uma grande concentração de arabinose e galactose, monossacarídeos também característicos de pectinas, além de glucose. Outros açúcares comuns às pectinas são a ramnose e a xilose, presentes nas frações em menor quantidade. A pequena quantidade de ramnose nos leva a inferir que há uma baixa proporção de ramnogalacturonanas em relação à de homogalacturonanas nas frações.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA^a DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DOS EXOCARPOS DE FRUTOS DE *Caryocar brasiliense*

Amostra	Monossacarídeos (mol %)							
	Rha	Ara	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glc	Ács. Urônicos ^b
ECf	1,0	18,1	0,3	3,9	2,9	6,4	11,4	56,0
ECf(d)	0,5	6,0	0,1	1,0	0,2	2,5	0,7	89,0
ECf(UP)	0,8	4,2	0,2	0,9	0,2	2,2	0,4	91,1
ECq	7,1	48,5	0	2,5	1,0	6,0	1,8	33,1
ECq(d)	0,9	6,6	0,1	0,6	0,8	6,6	1,4	83,0
ECq(UP)	0,8	5,0	0,2	0,6	0,8	7,4	1,5	83,7
EEf	1,6	29,7	0,1	4,9	3,4	4,2	10,4	45,7
EEf(d)	0,7	13,0	0,1	2,2	0,5	3,7	2,0	77,8
EEf(UP)	0,7	8,6	0,2	1,9	0,6	3,7	1,8	82,5
EEq	2,0	25,7	0,1	3,5	1,9	13,9	4,0	48,9
EEq(d)	1,2	12,2	0,3	2,1	2,0	18,5	3,9	59,8
EEq(UP)	1,3	10,5	0,4	2,1	2,5	17,3	4,5	61,4

a: determinado por GLC, mol%. Percentagem calculada sobre teor de açúcares neutros (dados não demonstrados).

b: determinado por método colorimétrico (Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991) e recalculado considerando o teor de carboidratos totais determinado pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois, 1956), em relação ao teor de açúcares neutros.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA^a DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DOS MESOCARPOS E PERICARPOS DE FRUTOS DE *Caryocar brasiliense*

Monossacarídeos (mol %)								
Amostra	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ács. Urônicos ^b
MCf	2,3	0	22,8	3,6	2,0	5,2	9,1	55,0
MCf(d)	1,6	0,2	17,2	3,1	0,6	6,1	2,6	68,6
MCf(UP)	0,8	0,1	6,2	1,3	0,2	3,5	0,9	87,0
MCq	1,8	0,1	22,8	1,5	0,6	20,1	3,2	49,9
MCq(d)	4,9	0,2	28,3	1,6	1,1	14,1	2,9	46,9
MCq(UP)	3,3	0,4	14,4	1,4	0,8	24,3	2,2	53,2
MEf	1,6	0	27,3	10,1	1,1	14,1	21,2	24,6
MEf(d)	0,2	0	3,5	1,1	0,1	2,1	0,9	92,1
MEf(UP)	0,6	0	3,1	2,2	0,3	2,7	1,1	90,0
MEq	2,1	0	19,6	5,9	1,4	23,6	5,4	42,0
MEq(d)	0,8	0,2	5,5	1,6	0,6	9,6	1,6	80,1
MEq(UP)	2,6	0,3	15,5	5,9	2,6	29,7	5,9	37,5
PCq	3,4	0,9	50,0	5,8	2,3	9,7	9,2	18,7
PCq(d)	1,1	0,2	14,5	2,0	0,8	12,2	2,9	66,3
PCq(UP)	1,2	0,2	14,3	2,1	0,8	10,3	2,4	68,7
PEq	0,9	0	30,7	5,1	1	8,4	6,1	47,8
PEq(d)	0,2	0	3,4	0,5	0,2	2,4	0,6	92,7
PEq(UP)	0,6	0,2	5,1	1,0	0,4	5,3	1,2	86,2
R	6,8	2,1	16,0	3,0	1,4	23,5	6,2	41

a: determinado por GLC, mol%. Percentagem calculada sobre teor de açúcares neutros (dados não demonstrados).

b: determinado por método colorimétrico (Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991), em relação ao teor de açúcares neutros.

É nítida a diminuição da concentração de arabinose nas frações dialisadas contra água destilada e também nas dialisadas em água ultra-pura, indicando que moléculas pequenas contendo este monossacarídeo tenham ultrapassado a membrana. Juntamente à arabinose, os demais açúcares neutros também diminuíram em concentração após a diálise, aumentando a concentração de ácidos urônicos.

Por se tratarem de amostras praticamente purificadas (vide seção 4.3, análise por HPSEC-MALLS), a composição monossacarídica das frações dialisadas contra água ultra-pura foi realizada em triplicata.

4.2 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C das frações polissacarídicas de *Caryocar brasiliense*

Os espectros de RMN de ^{13}C obtidos para as frações polissacarídicas da casca de Pequi, representados nas figuras 11, 12 e 13, apresentam assinalamentos coincidentes aos observados para o espectro de uma pectina padrão, presente na região superior de todas as figuras, levando-nos a concluir que o maior constituinte destas frações é, de fato, uma pectina, conforme inferido nas análises da composição monossacarídica.

É possível destacar nos espectros de todas as frações os sinais em 100,1 e 99,8, correspondentes aos carbonos anoméricos (C-1) de unidades esterificadas e não esterificadas, respectivamente, de ácido galacturônico (1→4) ligadas. O sinal em 78,6 ppm corresponde ao C-4 glicosidicamente substituído e os carbonos C-2, C-3 e C-5 foram assinalados em 68,2, 70,6 e 71,4 ppm, respectivamente. Em 170,6 ppm o sinal é atribuído ao C-6 metil-esterificado das unidades de α -D-GalpA e, em 52,8 ppm, o sinal referente ao carbono do grupo metoxil (KENNAN *et al.*, 1985; MUKHIDDINOV *et al.*, 2000; MONGE *et al.*, 2007; TAMAKI *et al.*, 2008; VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009).

Os deslocamentos químicos associados ao C-1 e C-6 dependem do grau de esterificação das unidades de α -D-GalpA (MONGE *et al.*, 2007). Desta forma, é possível verificar que, apesar de ocorrerem sinais em aproximadamente 99,8 ppm, estes são menos intensos quando comparados aos picos em 100,1 pm. Da mesma forma, deslocamentos químicos correspondentes ao C-6 de unidades não esterificadas de α -D-GalpA não estão presentes, indicando que em todas as frações ocorre a predominância da forma metoxilada (α -D-GalpAOMe) do monossacarídeo.

É possível distinguir nos espectros das amostras extraídas a quente, ECq(d), EEq(d), MCq, MEq, PCq, PEq e R, sinais característicos de unidades β -D-Galp (1 \rightarrow 4) ligadas em 104,4, 71,7, 73,5, 77,6, 74,6 e 60,9 ppm, referentes aos carbonos C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 do anel piranosídico, respectivamente (CIPRIANI *et al.*, 2009). Nas amostras extraídas a frio estes sinais não são evidentes, o que demonstra a semelhança existente entre as frações extraídas sob as mesmas condições, independentemente da porção do fruto da qual foram extraídas.

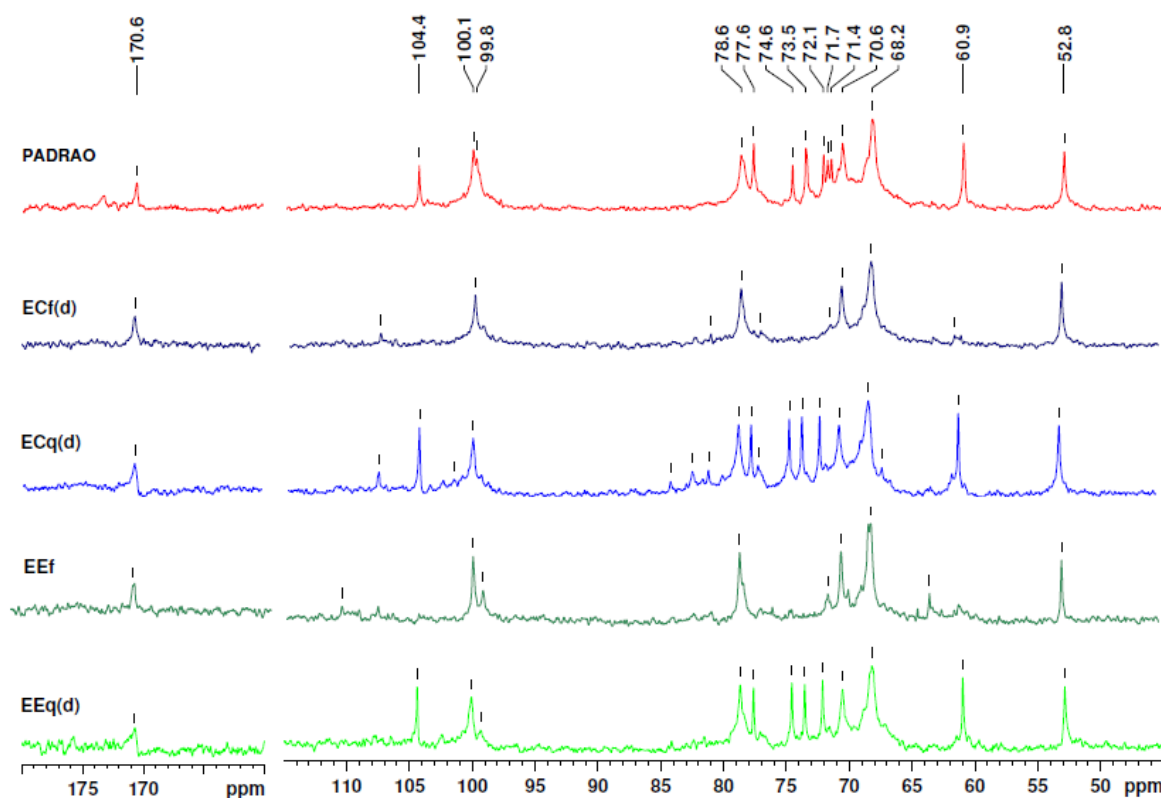


FIGURA 11 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS DOS EXOCARPOS CLARO E ESCURO DE FRUTOS DE *Caryocar brasiliense*

Apesar do alto teor de arabinose evidenciado em todas as amostras, seus sinais característicos em aproximadamente 110 e 107 ppm não são evidenciados. Os sinais característicos de unidades de ramnose presentes nas ramnogalacturonanas em 97,8 e 16,7 ppm (C-1 e C-6) não foram observados nos espectros obtidos. Aliado aos resultados da composição monossacarídica, que

indicaram baixa percentagem molar de ramnose nas frações, este fato nos leva a concluir a baixa quantidade ou inexistência de ramnogalacturonanas nas amostras, sendo estas últimas constituídas por cadeias principais de homogalacturonanas.

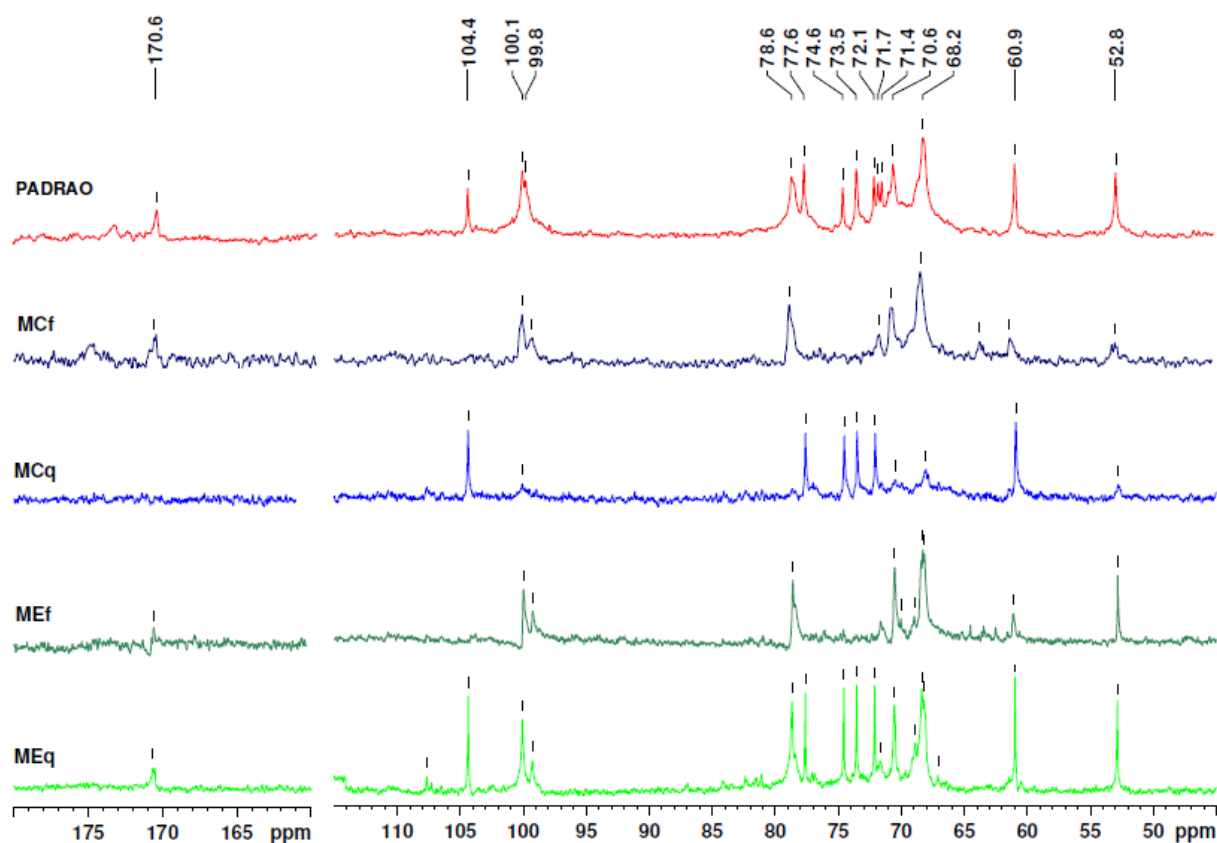


FIGURA 12 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS DOS MESOCARPOS EXTERNOS CLARO E ESCURO DE FRUTOS DE *Caryocar brasiliense*

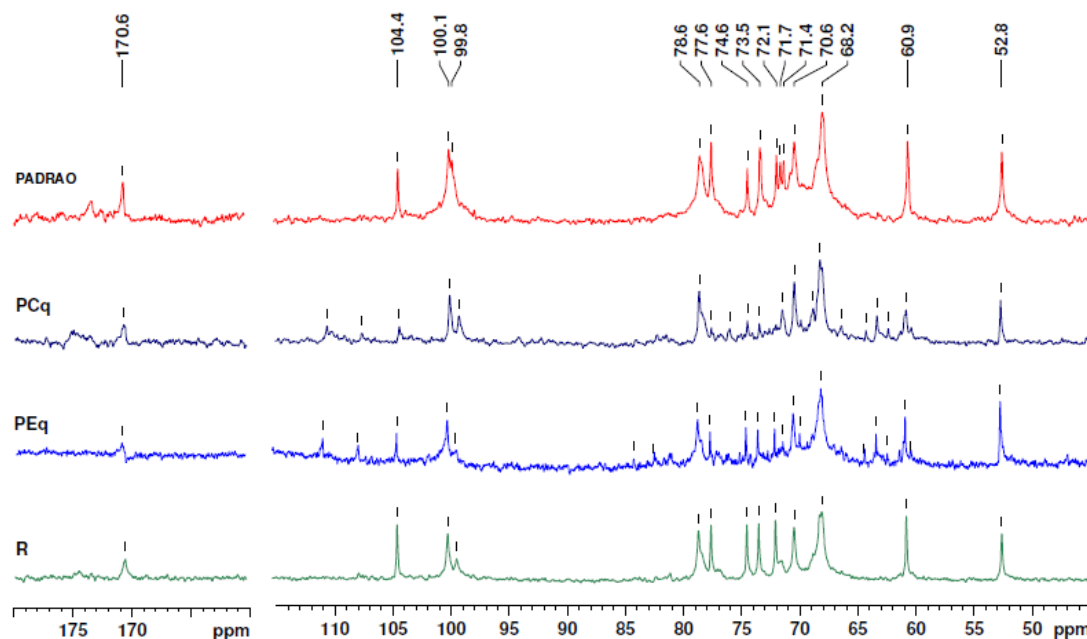


FIGURA 13 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS DOS PERICARPOS CLARO E ESCURO DE FRUTOS DE *Caryocar brasiliense*

4.3 Ressonância magnética nuclear de ^1H – determinação do grau de metoxilação e acetilação

A funcionalidade das pectinas *in vitro* e *in vivo* dependem da quantidade de grupos iônicos ligados ao polímero, bem como sua distribuição ao longo do esqueleto principal (CAMERON *et al.*, 2008). Assim sendo, a determinação dos graus de metoxilação (DM) e acetilação (DA) se faz importante para se prever o comportamento das moléculas de pectina em solução.

Como os deslocamentos químicos dos carbonos um e seis dependem do grau de esterificação das unidades de $\alpha\text{-D-GalpA}$, é possível prever o grau de esterificação da cadeia pécica através da comparação entre as áreas integradas dos picos dos carbonos um ou dos carbonos seis esterificados e não esterificados (MONGE *et al.*, 2007). Como os sinais relativos às unidades não esterificadas não estão evidentes nos espectros de RMN de ^{13}C , fica difícil calcular a razão entre a área de seus picos para comparação com a área daqueles referentes às unidades esterificadas. Além disso, é sabido que a sensibilidade da ressonância de ^{13}C é

menor que a de ^1H . Sendo assim, os métodos de Bédouet, Courtois e Courtois (2003) e Rosenbohm *et al.* (2003) foram utilizados neste trabalho para a determinação do grau de acetilação (DAc) e metoxilação (DM), respectivamente, das pectinas oriundas da casca de Pequi. De acordo com o primeiro método, foi realizada a saponificação das amostras, de modo a romper a ligação dos grupamentos metil e acetil com os carbonos do anel e, assim, obter um espectro mais simples e picos distintos para o metanol e para o acetato, facilitando a quantificação deste último. A Figura 14 ilustra estes processo representando os espectros da amostra ECq nativa e após a saponificação com NaOD.

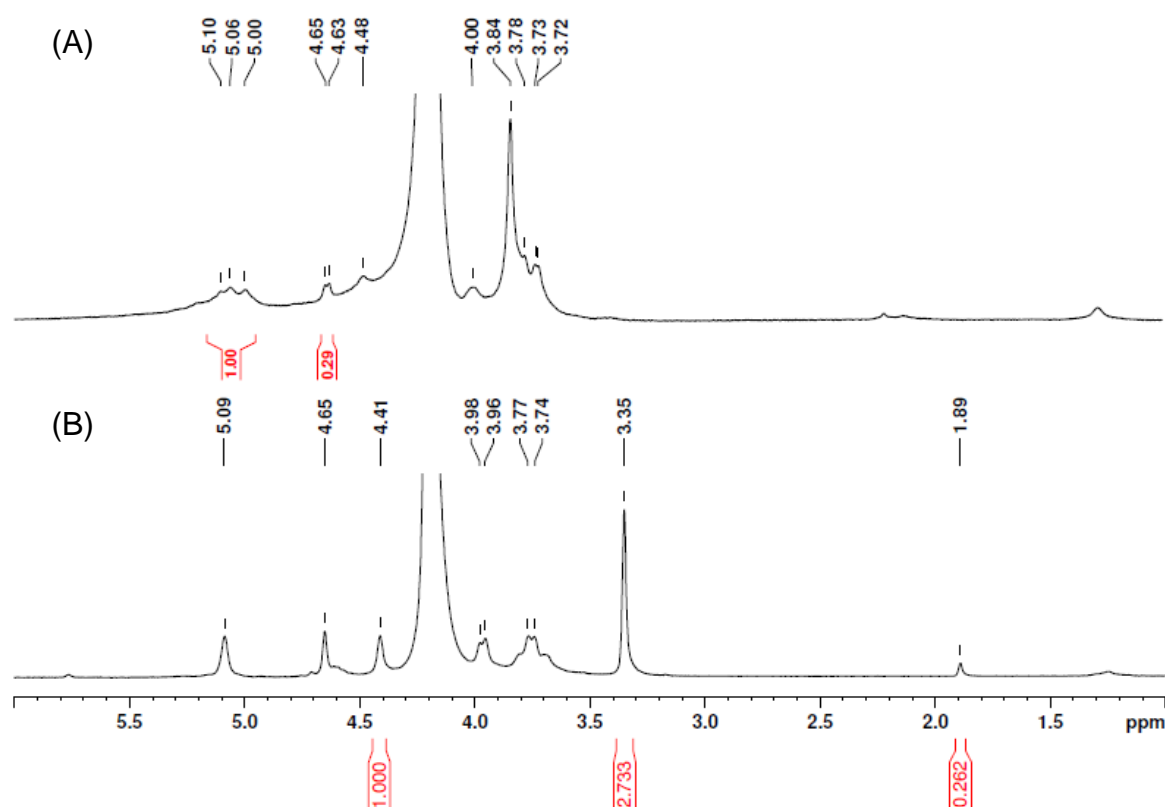


FIGURA 14 - ESPECTROS DE ^1H RMN DA AMOSTRA ECf OBTIDOS ANTES E APÓS A SAPONIFICAÇÃO: (A) AMOSTRA NATIVA; (B) AMOSTRA SAPONIFICADA

Na tabela 7 são descritos os deslocamentos químicos dos hidrogênios das unidades de $\alpha\text{-D-GalpA}$ metoxilados (nativas) e após a saponificação (ácidos urônicos) da amostra EEq.

TABELA 7 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS HIDROGÊNIOS REFERENTES ÀS UNIDADES DE α -D-GalpA-(1 \rightarrow 4) LIGADAS DAS AMOSTRAS ECf NATIVA E APOS SAPONIFICAÇÃO

Amostra	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	COCH ₃	CH ₃ OH
Nativa	5,00– 5,07	ND*	ND*	4,48	5,00/5,06/5,1 – 4,63/4,65	3,85	ND*
Saponificada	5,09	3,74 – 3,77	3,96 – 3,98	4,41	4,65	3,35	1,89

*ND – não determinado

De acordo com Rosenbohm *et al.* (2003), nos espectros de RMN de ^1H de pectinas HM os sinais referentes aos hidrogênios um (H-1) e cinco (H-5) das unidades de ácido galacturônico apresentam-se em dois picos em torno de 5 ppm, enquanto em pectinas LM o sinal do H-5 se encontra em aproximadamente 4,6 - 4,8 ppm e o sinal de H-1 em campo mais baixo (ROSENBOHM *et al.*, 2003). A partir da observação do espectro 14(a), referente à amostra ECf nativa, ou seja, antes da saponificação, bem como da Tabela 7, verificam-se três picos relativos ao H-5 em 5,00, 5,06 e 5,1 e dois em 4,63 e 4,65 ppm. Após o procedimento de saponificação, um sinal mais intenso surge em 4,65 (Figura 14B), o que nos leva a concluir que houve liberação dos grupos metoxil dos grupos carboxílicos, tornando a molécula pouco metoxilada (LM). Os prótons ligados aos carbonos dois e três (H-2 e H-3) são encontrados em 3,74 - 3,77 e 3,96 e 3,98 ppm, respectivamente e usualmente não são afetados pela metoxilação dos resíduos de ácidos carboxílicos (BÉDOUET; COURTOIS; COURTOIS, 2003; ROSENBOHM *et al.*, 2003). Os prótons quatro (H-4) são evidentes em 4,48 ppm nas amostras nativas e são deslocados ligeiramente para campo mais alto (4,41) após a eliminação da esterificação com a saponificação (ROSENBOHM *et al.*, 2003).

O mesmo padrão de sinais é encontrado para o padrão e todas as frações nativas (Figuras 15, 16 e 17) e saponificadas (Figuras 18, 19 e 20).

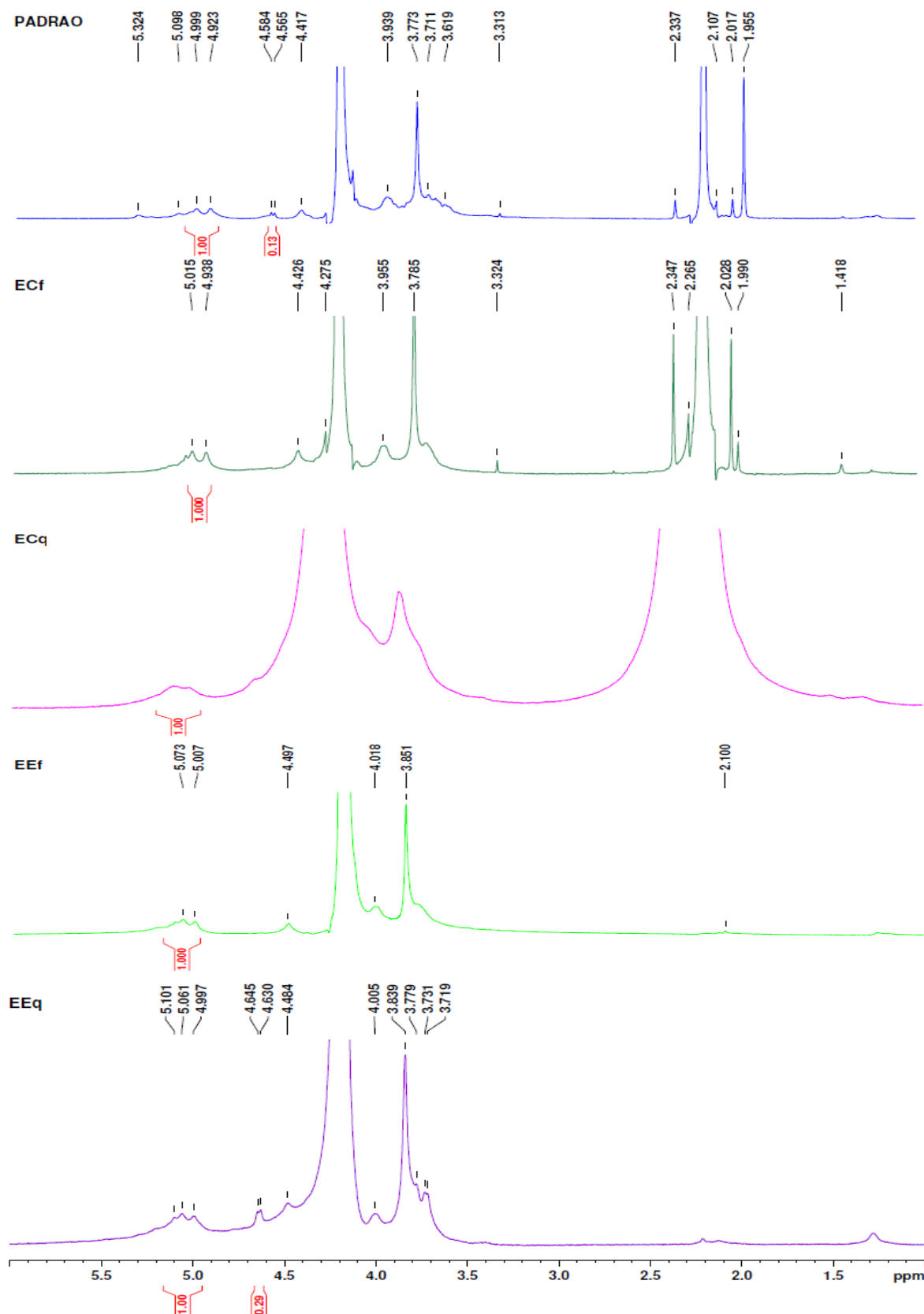


FIGURA 15 - ESPECTRO DE ^1H RMN DO PADRÃO DE PECTINA DE MAÇÃO SIGMA® E DAS AMOSTRAS ECf, ECq, EEf E EEq NATIVAS

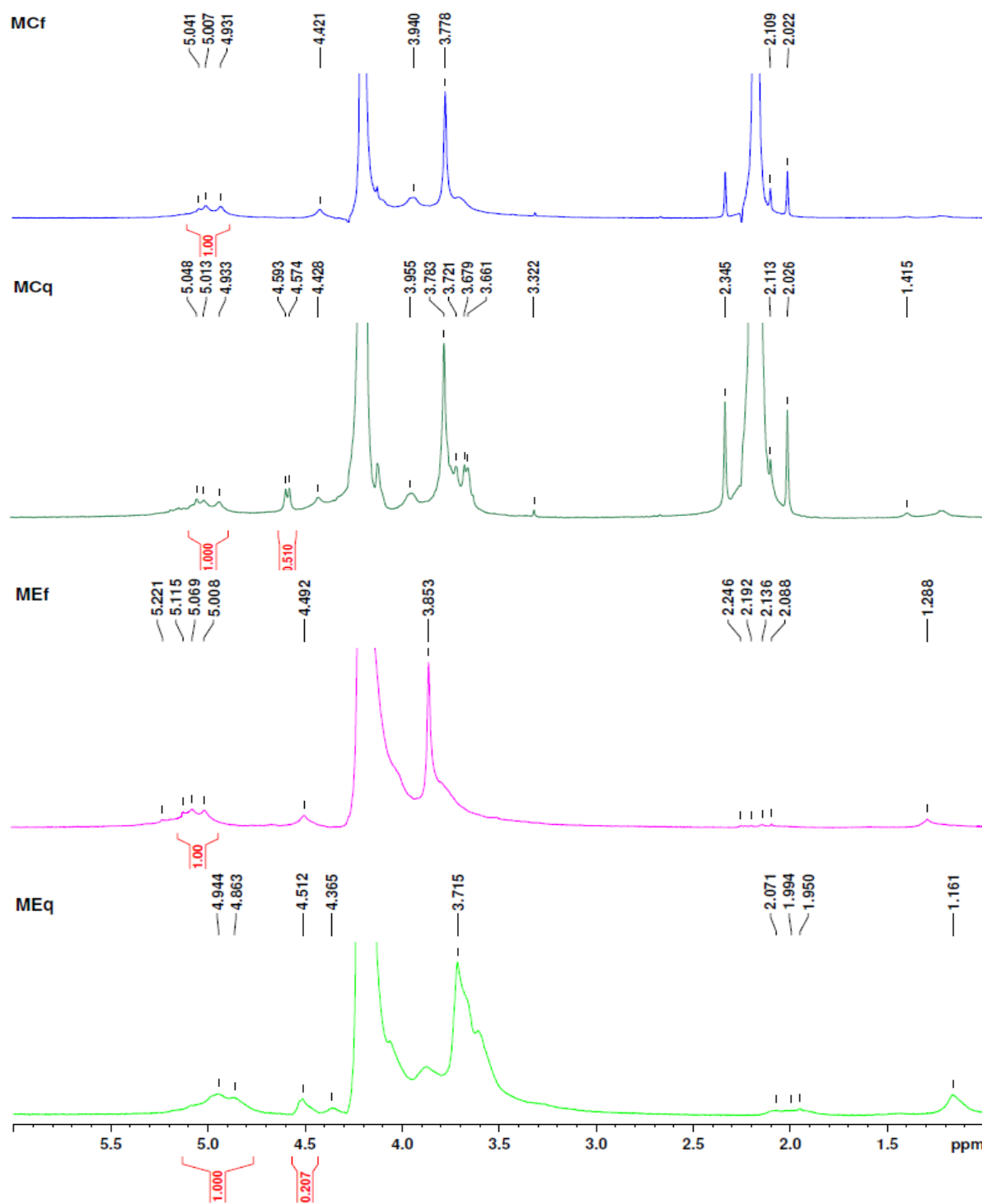


FIGURA 16 - ESPECTRO DE ^1H RMN DAS AMOSTRAS MCf, MCq, MEf E MEq NATIVAS

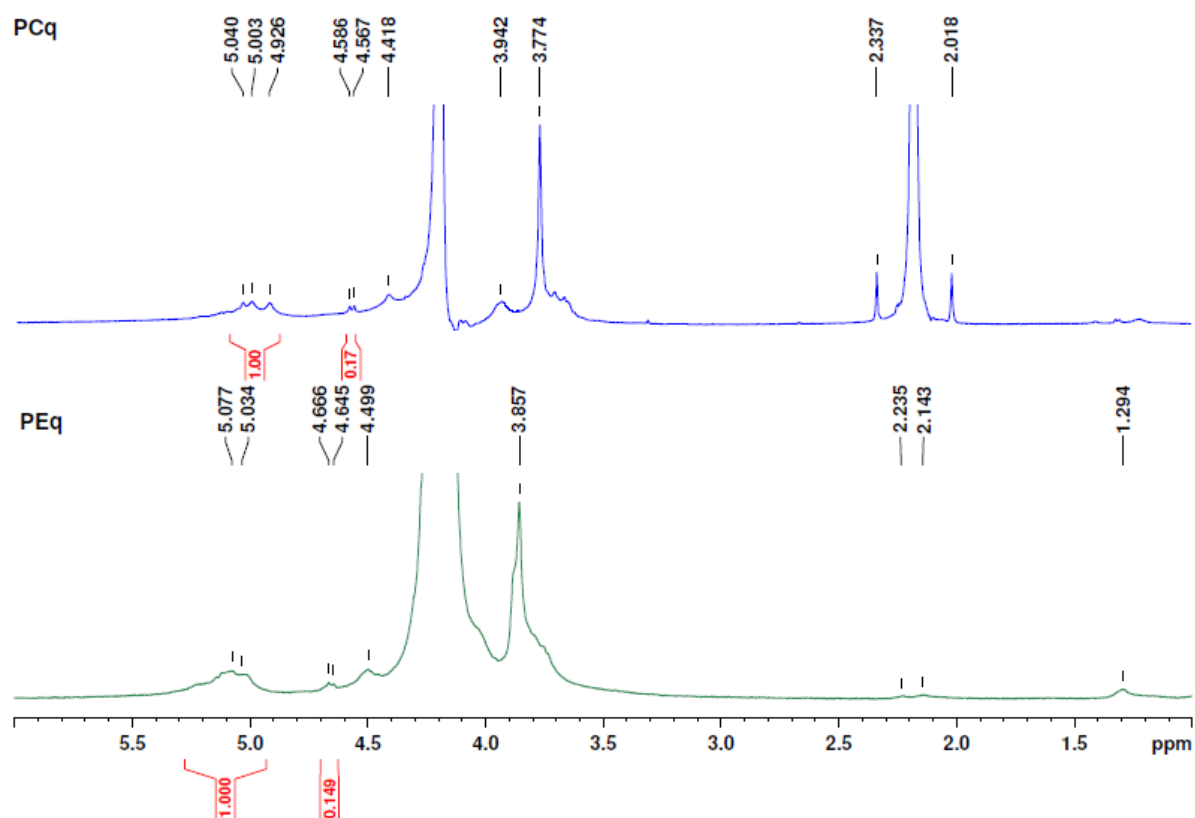


FIGURA 17 - ESPECTRO DE ^1H RMN DAS AMOSTRAS PCq E PEq NATIVAS

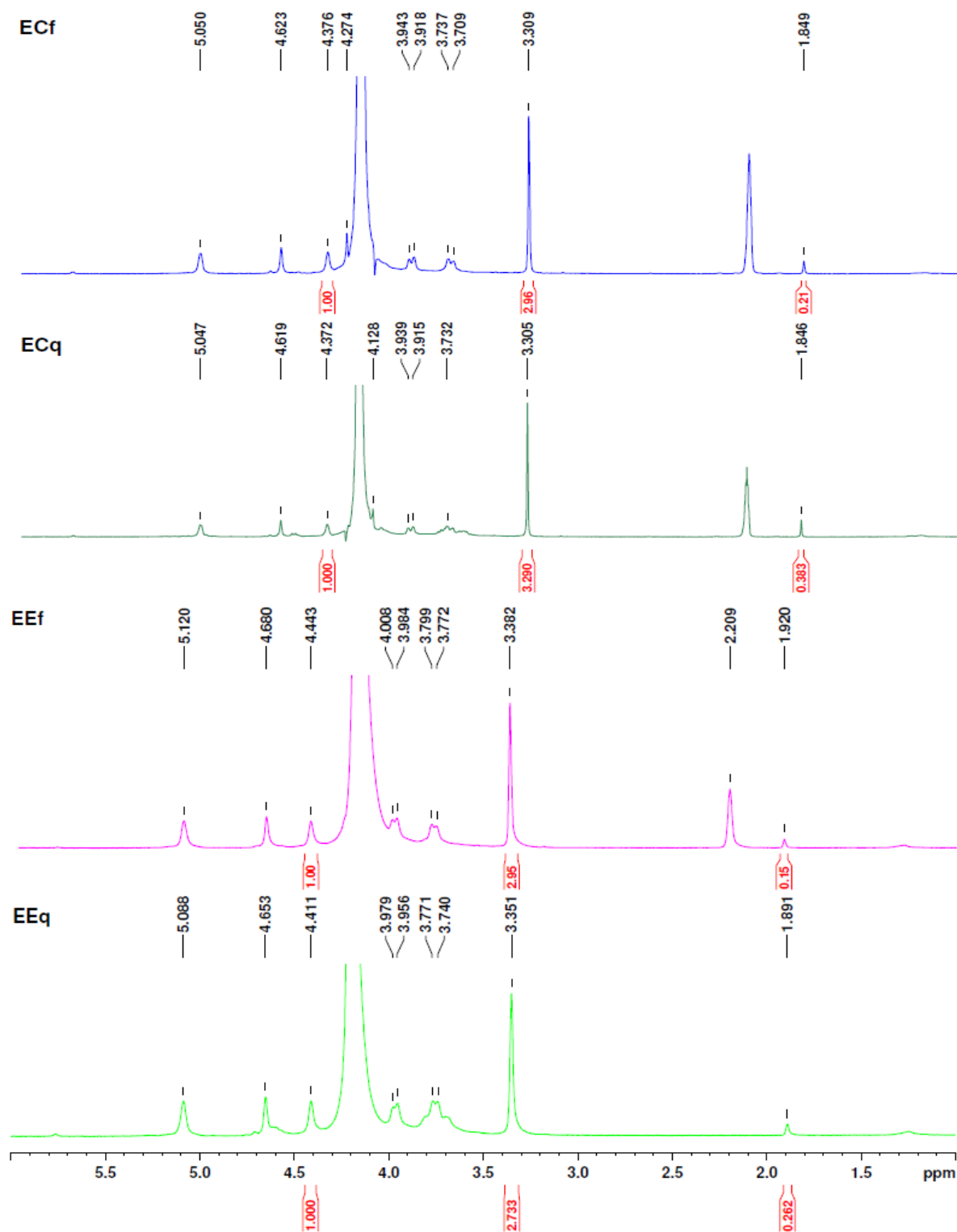


FIGURA 18 - ESPECTRO DE ^1H RMN E DAS AMOSTRAS ECf, ECq, EEf E EEq SAPONIFICADAS

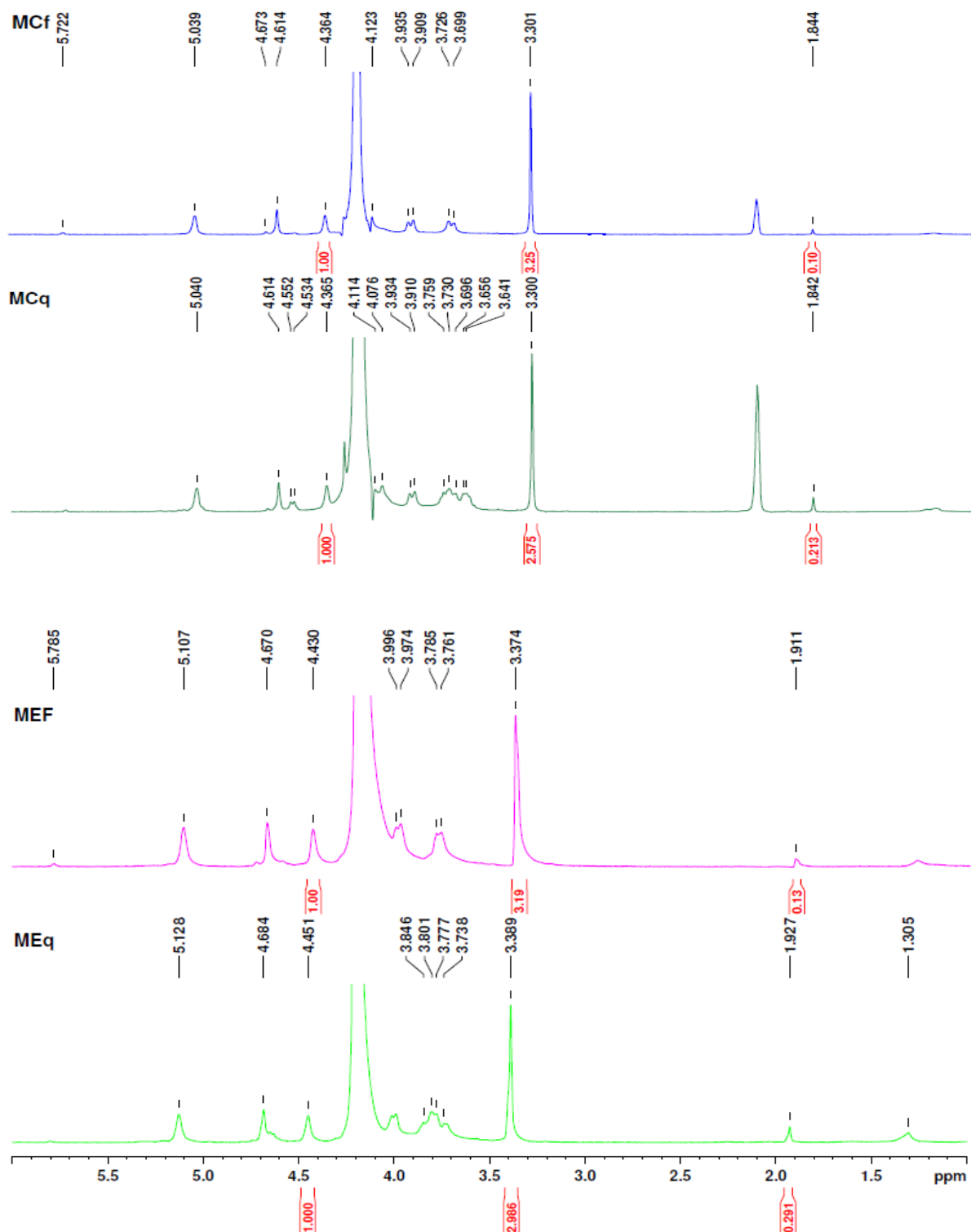


FIGURA 19 - ESPECTRO DE ^1H RMN DAS AMOSTRAS MCf, MCq, MEF E MEq SAPONIFICADAS

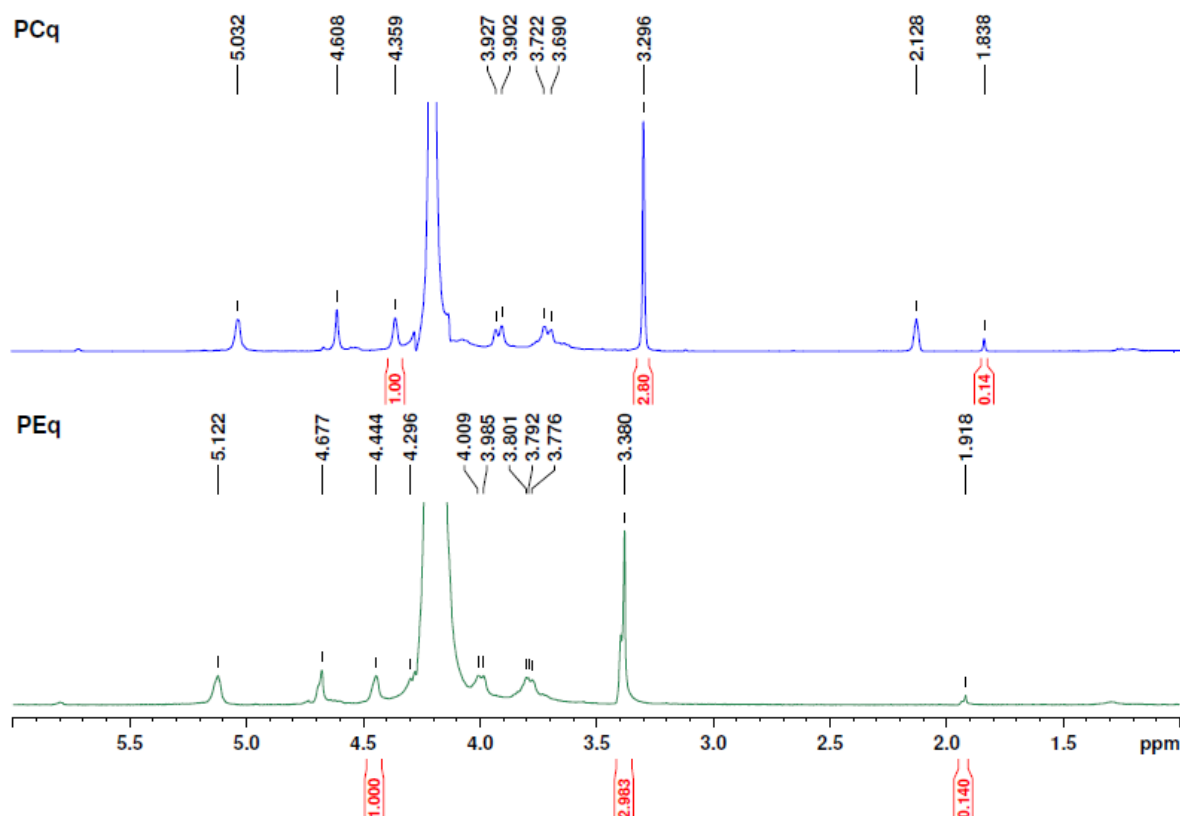


FIGURA 20 - ESPECTRO DE ^1H RMN DAS AMOSTRAS PCq E PEq SAPONIFICADAS

O grau de metoxilação (DM) é definido como a quantidade de grupos éster em relação ao montante total de ácidos carboxílicos livres ou esterificados. Para a determinação do DM, Rosenbohm *et al.* (2003) utilizam a equação a seguir:

$$\begin{aligned}
 \text{DM} &= \frac{I_{\text{COOMe}}}{I_{\text{COOMe}} + I_{\text{COO}^-}} = \frac{2I_{\text{COOMe}}}{2(I_{\text{COOMe}} + I_{\text{COO}^-})} \\
 &= \frac{I_{\text{COOMe}} + I_{\text{COOMe}} + (I_{\text{COO}^-} - I_{\text{COO}^-})}{I_{\text{COOMe}} + I_{\text{COOMe}} + I_{\text{COO}^-} + I_{\text{COO}^-}} \\
 &= \frac{(I_{\text{COOMe}} + I_{\text{H1}}) - I_{\text{COO}^-}}{(I_{\text{COOMe}} + I_{\text{H1}}) + I_{\text{COO}^-}}
 \end{aligned}$$

As integrais dos sinais referentes aos H-5 das unidades metil esterificadas (I_{COOMe}) são comparados, neste método, à soma destas às dos picos de H-5 das unidades livres. Dada a proximidade ou até mesmo a sobreposição, em muitos casos, dos sinais dos H-1 com os dos H-5 das unidades esterificadas nas amostras

não saponificadas, somente é possível determinar uma integral combinada destes dois sinais, ou seja, $I_{H1} + I_{COOMe}$. Como a quantidade de prótons H-5 é igual à de prótons H-1 ($I_{COOMe} + I_{COO^-} = I_{H1}$), é possível utilizar este cálculo seguramente (ROSENBOHM *et al.*, 2003).

Para a determinação do DA, Bédouet, Bédouet e Courtois (2003) relacionam a integral da área do pico de acetis livres com a área do H-4, sendo que este corresponde à totalidade dos ácidos galacturônicos.

Desta forma, os DM e DA das frações pécticas extraídas da casca de Pequi são descritos na tabela 8, abaixo.

TABELA 8 - GRAU DE ESTERIFICAÇÃO E ACETILAÇÃO DAS FRAÇÕES PÉCTICAS OBTIDAS DA CASCA DE *Caryocar brasiliense*

AMOSTRA	ECf	ECq	EEf	EEq	MCf	MCq	MEf	MEq	PCq	PEq	Padrão®
DAc (%)	7,1	12,8	5,1	8	3,3	7,1	4,5	9,7	4,6	4,7	71,6
DM (%)	100	100	100	54,8	100	32,5	100	65,7	71	74	76

Todas a frações apresentam alto grau de metoxilação (DM), com exceção da amostra MCq, e baixo teor de acetilação, o que classifica as pectinas extraídas da casca de *Caryocar brasiliense* como HM. Um alto DM é consistente com o método de extração à qual foram submetidas as diferentes porções do fruto (VORAGEN *et al.*, 1995).

O método de Rosenbohm *et al.* (2003) foi adequadamente validado, pois o valor de DM obtido para o padrão foi o mesmo descrito na ficha técnica do produto.

4.4 Análise por HPSEC-MALLS

As análises por HPSEC-MALLS das frações MEf, MEq, PCq e PEq são apresentadas na Figura 21. O detector de índice de refração (IR) fornece sinal

proporcional à concentração, enquanto que a resposta do detector de espalhamento de luz laser de multiangulos (MALLS) é dependente da massa molecular (HOKPUTSA *et al.*, 2004).

Os cromatogramas das frações MEf, MEq, PCq e PEq (Figura 21) apresentaram perfis de eluição semelhantes, caracterizados pela presença de um pico largo eluindo entre 37 e 45 min detectado pelo detector IR. Nos cromatogramas de HPSEC destas frações (Figura 21) esta molécula também é detectada pelo detector MALLS, indicando se tratar de um polissacarídeo de elevada massa molecular.

A partir do detector IR verifica-se um perfil altamente heterogêneo, onde se observam diferentes picos eluindo a partir de 50 e 60 min, indicando a presença de moléculas de menor massa molecular. O pico intenso identificado em 70 min é característico de amostras com alta concentração de sais. A presença desta grande quantidade de elementos de baixa massa molecular e sais faz com que a molécula de maior massa molecular, o elemento objeto da pesquisa, esteja presente em relativamente baixa concentração. A fim de possibilitar a detecção das moléculas, o detector de espalhamento de luz tem sua sensibilidade automaticamente aumentada, o que gera um cromatograma pouco definido e com ruídos, como os observados para estas frações primariamente analisadas.

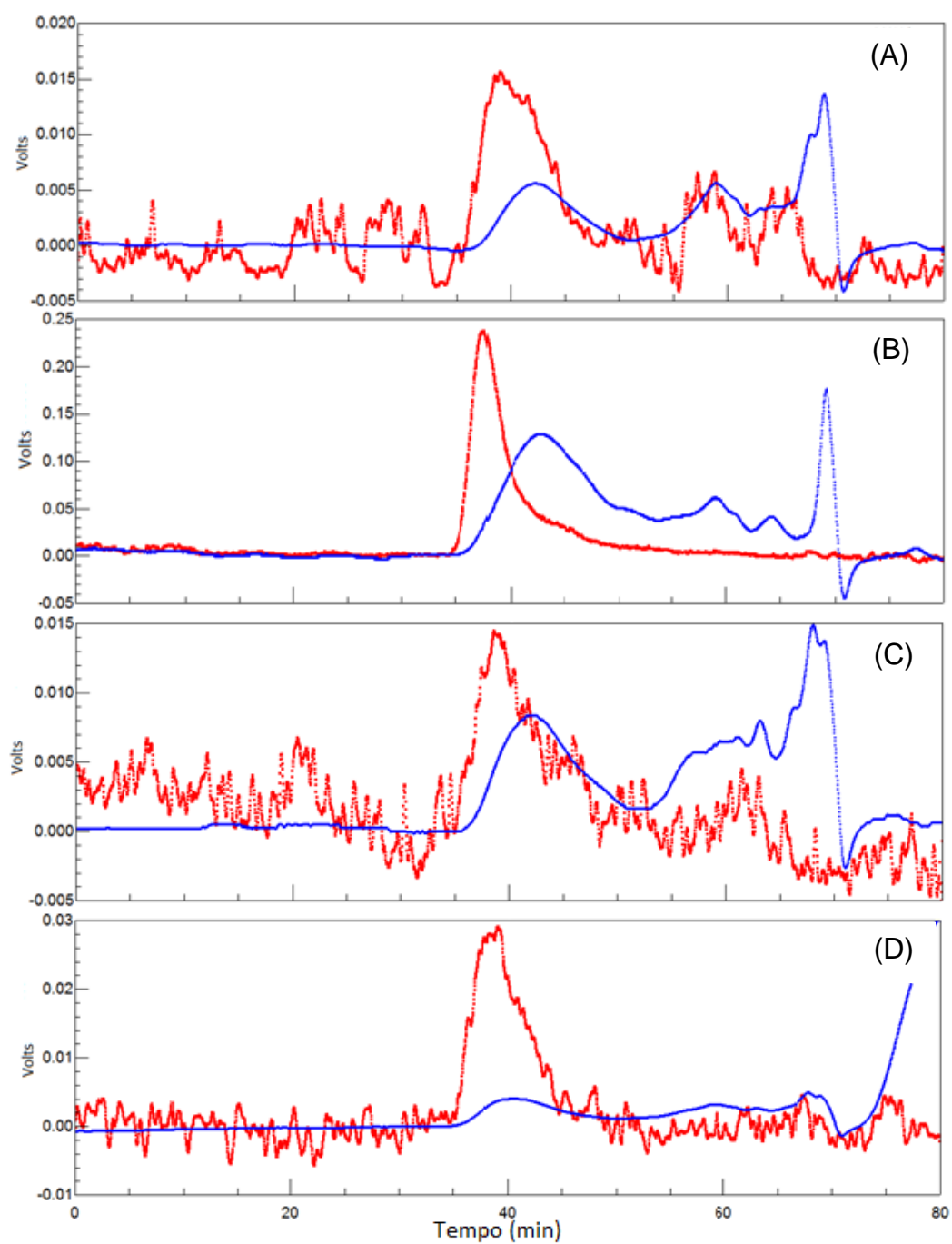


FIGURA 21 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC - MALLS DAS FRAÇÕES DO MESOCARPO ESCURO E DOS PERICARPOS CLARO E ESCURO. (A) AMOSTRA MEf; (B) MEq; (C) PCq; (D) PEq

A análise por HPSEC-MALLS das frações após a primeira etapa de purificação (item 3.3) foi realizada apenas nas amostras MEf, MEq, PCq e PEq, pois inferiu-se que todas as frações apresentariam o mesmo perfil de eluição, uma vez que foram extraídas de forma semelhante. Assim, as demais frações não foram analisadas.

Na tentativa de retirar as moléculas de menor massa e sais e purificar a molécula de maior massa, melhorando, assim, a qualidade dos cromatogramas, todas as amostras foram submetidas à diálise conforme item 3.4. As figuras 22 a 25 ilustram os cromatogramas, utilizando o detector de índice de refração das amostra MEf, MEq, PCq e PEq após as diálises contra água destilada e Milli-Q, em comparação com os cromatogramas das amostras nativas.

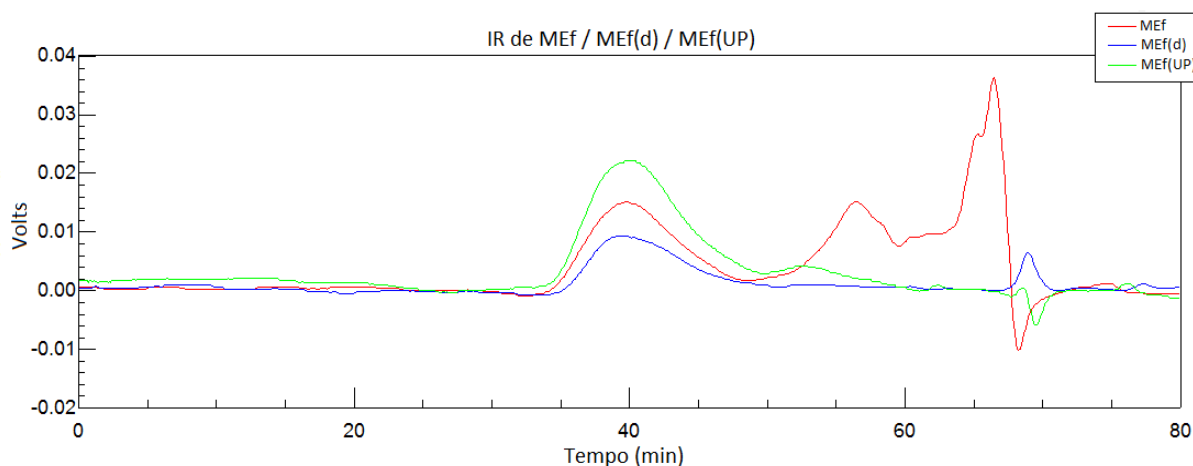


FIGURA 22 - COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMATOGRAMAS (DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) DAS AMOSTRAS MEf, MEf(d) E MEf(UP)

A redução progressiva na dimensão e quantidade de picos no detector IR após 50 min nos permite afirmar que houve uma redução no teor de moléculas de menor massa molecular e sais após as diálises, embora nos cromatogramas das amostras MEq(UP) e PCq(UP), frações em que se esperava maior grau de pureza, ainda ocorrem picos intensos eluindo em torno de 65 min. O pico em 37 min, correspondente à molécula de maior massa molecular, aumentou significativamente

nos cromatogramas das amostras MEf(d), MEf(UP) e, em menor intensidade, nos cromatogramas das amostras PCq(d), PCq(UP), PEq(d) E PEq(UP), indicando que, com a diminuição da concentração das moléculas de menor massa e sais ao longo das diálises, ocorreu aumento na concentração do polissacarídeo.

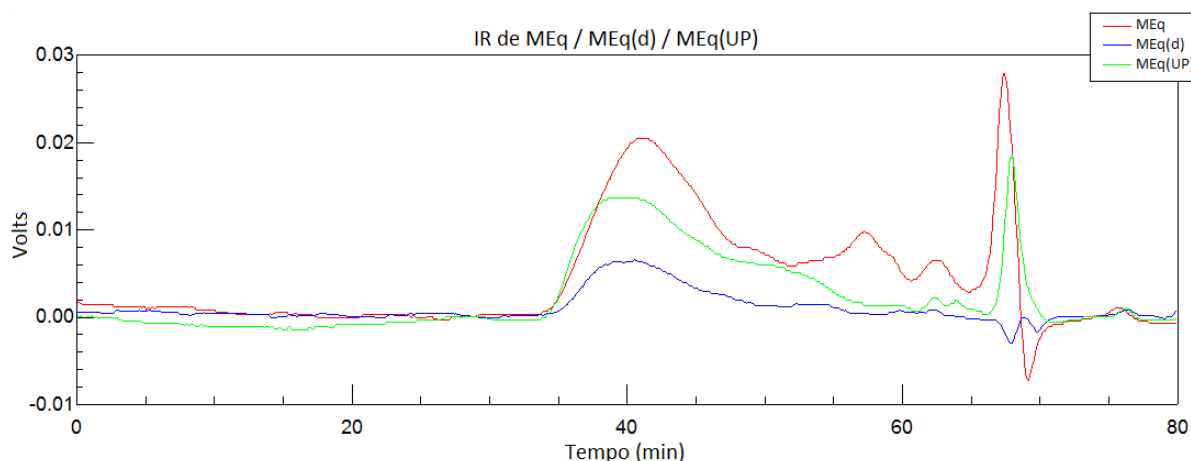


FIGURA 23 - COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMATOGRAMAS (DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) DAS AMOSTRAS MEq, MEq(d) E MEq(UP)

Ao se observar a diminuição de intensidade dos picos nas frações dialisadas da amostra MEq em relação à amostra nativa, percebe-se que houve uma relativa diminuição na concentração do polissacarídeo, fato atribuído, provavelmente, à retenção do polissacarídeo no filtro durante o preparo da amostra. Este fato se comprova ao se verificar o alargamento do pico eluído em 37 min da amostra MEq(UP), revelando o aumento no caráter polidisperso da molécula, ou seja, o surgimento de moléculas menores próximas em tamanho ao elemento central.

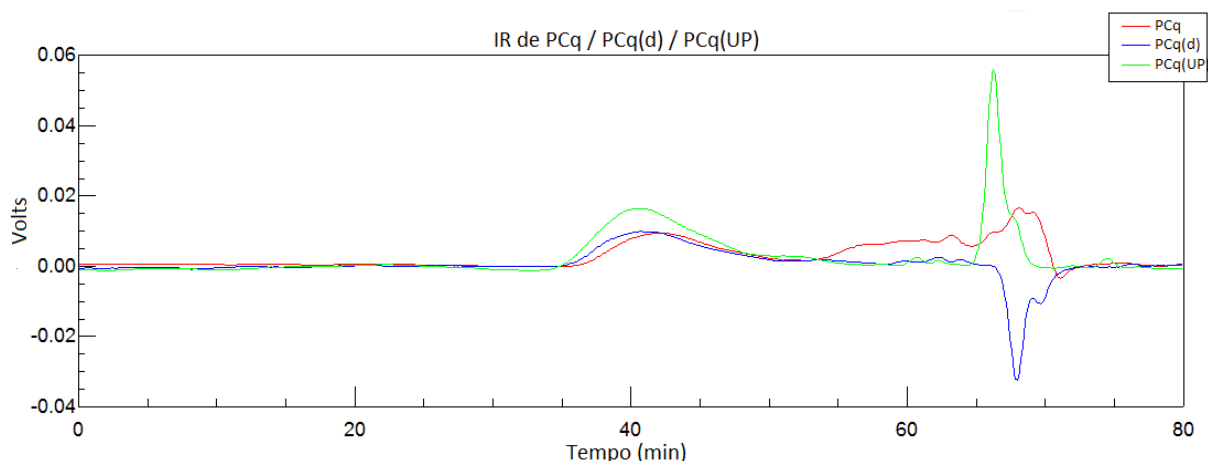


FIGURA 24 - COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMATOGRAMAS (DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) DAS AMOSTRAS PCq, PCq(d) E PCq(UP)

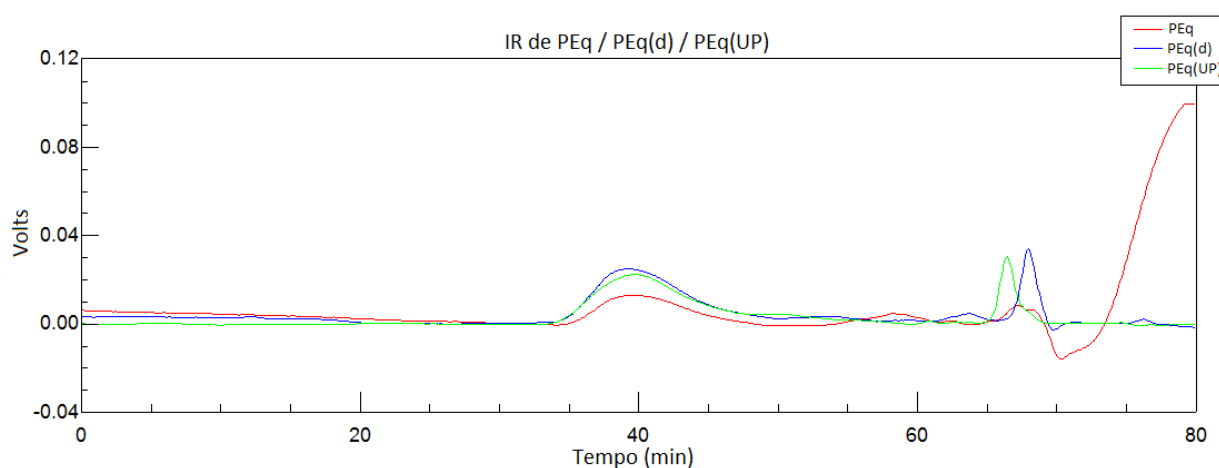


FIGURA 25 - COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMATOGRAMAS (DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO) DAS AMOSTRAS PEq, PEq(d) E PEq(UP)

Após as diálises, com a atenuação da concentração de moléculas pequenas e sais, conforme verificado pelo índice de refração, os ruídos dos cromatogramas obtidos com o detector MALLS desapareceram e tornou-se possível a correta avaliação do experimento, conforme mostrado na Figura 26.

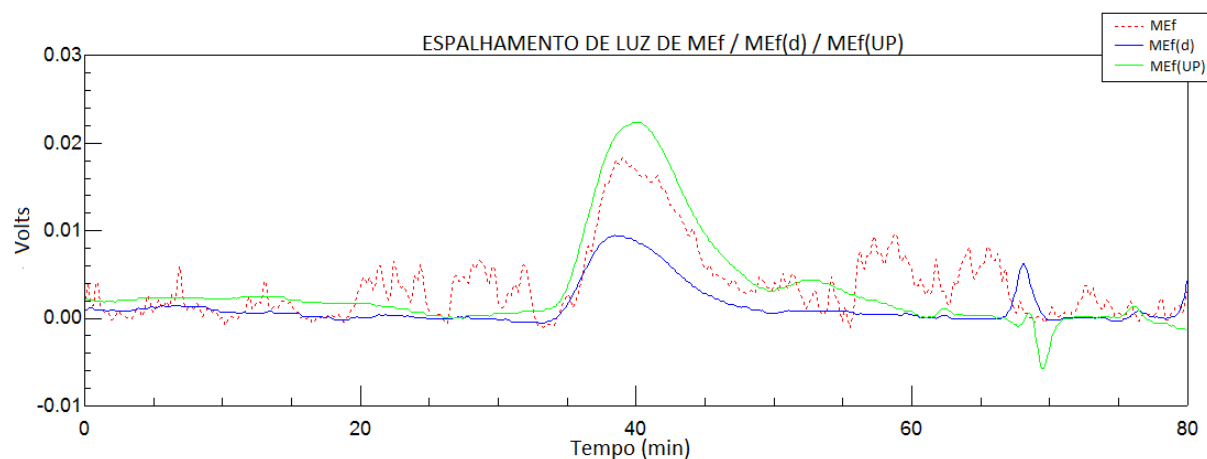


FIGURA 26 - COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMATOGRAMAS (DETECTOR DE ESPALHAMENTO DE LUZ) DAS AMOSTRAS MEF, MEF(d) E MEF(UP)

A partir destes resultados, foi realizada a avaliação da homogeneidade de todas as frações após as diálises (figuras 27 a 29).

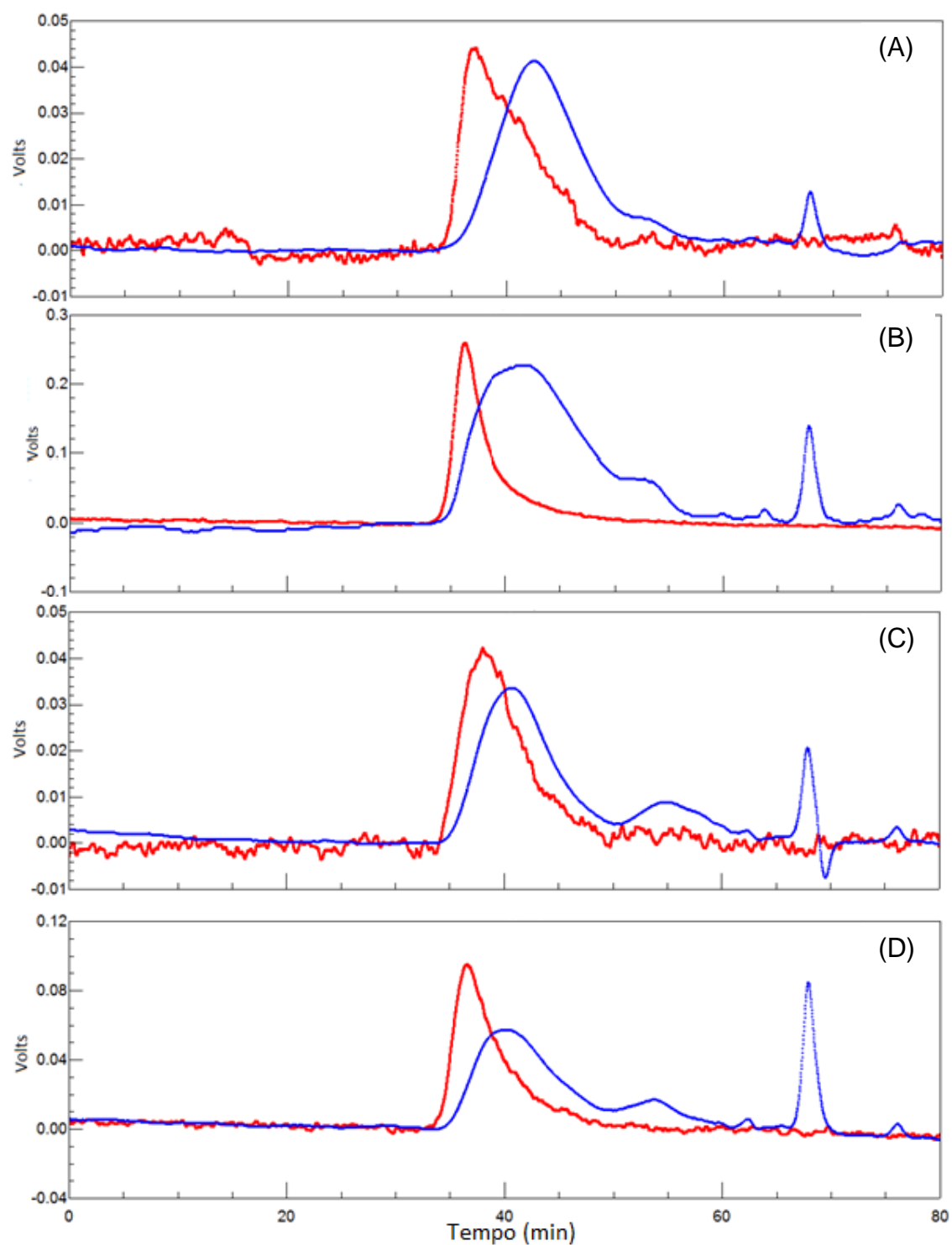


FIGURA 27 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC - MALLS DAS FRAÇÕES DOS EXOCARPOS CLARO E ESCURO. (A) AMOSTRA ECf(UP); (B) ECq(UP); (C) EEf(UP); (D) EEq(UP)

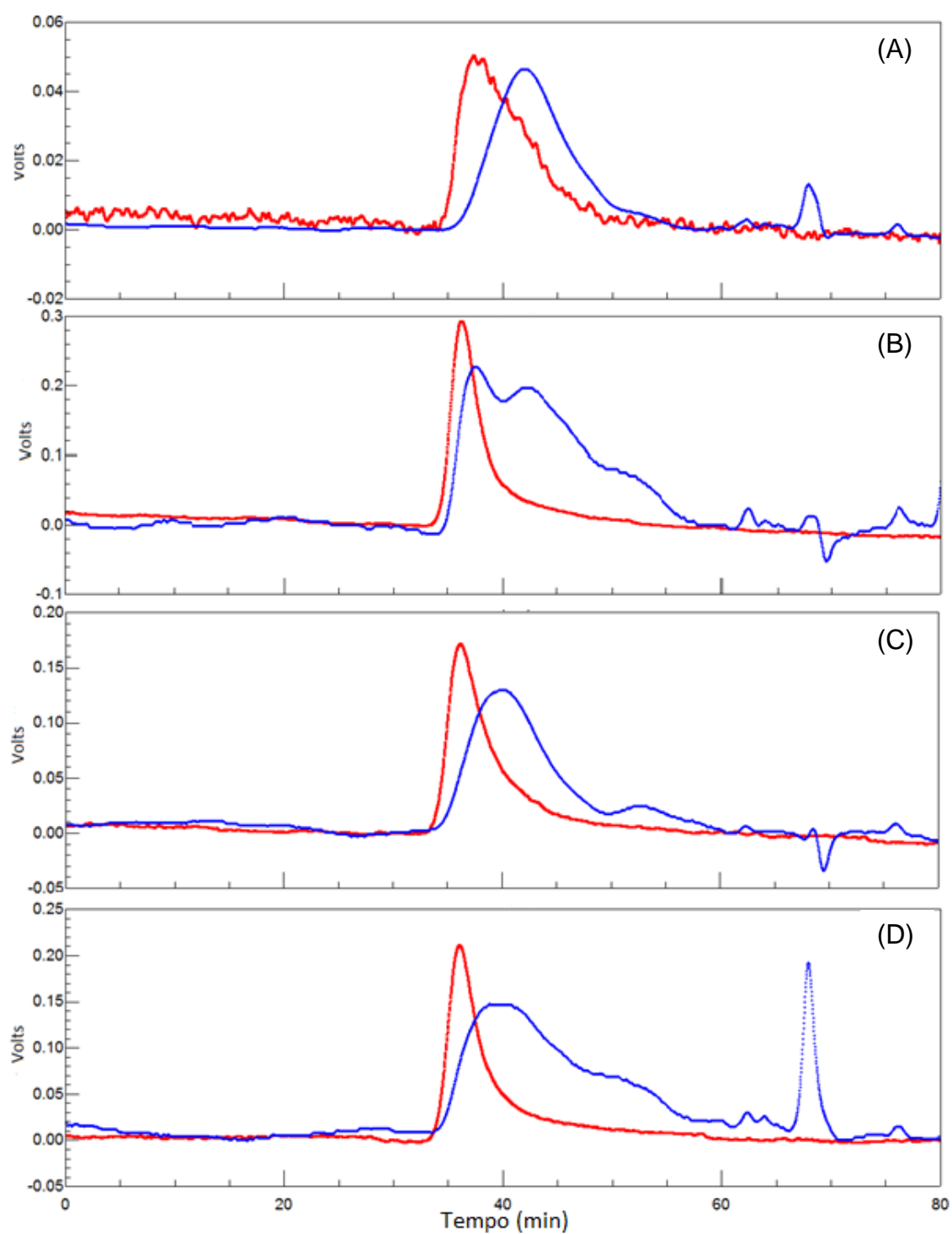


FIGURA 28 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC - MALLS DAS FRAÇÕES DOS MESOCARPOS CLARO E ESCURO. (A) AMOSTRA MCf(UP); (B) MCq(UP); (C) MEf(UP); (D) MEq(UP)

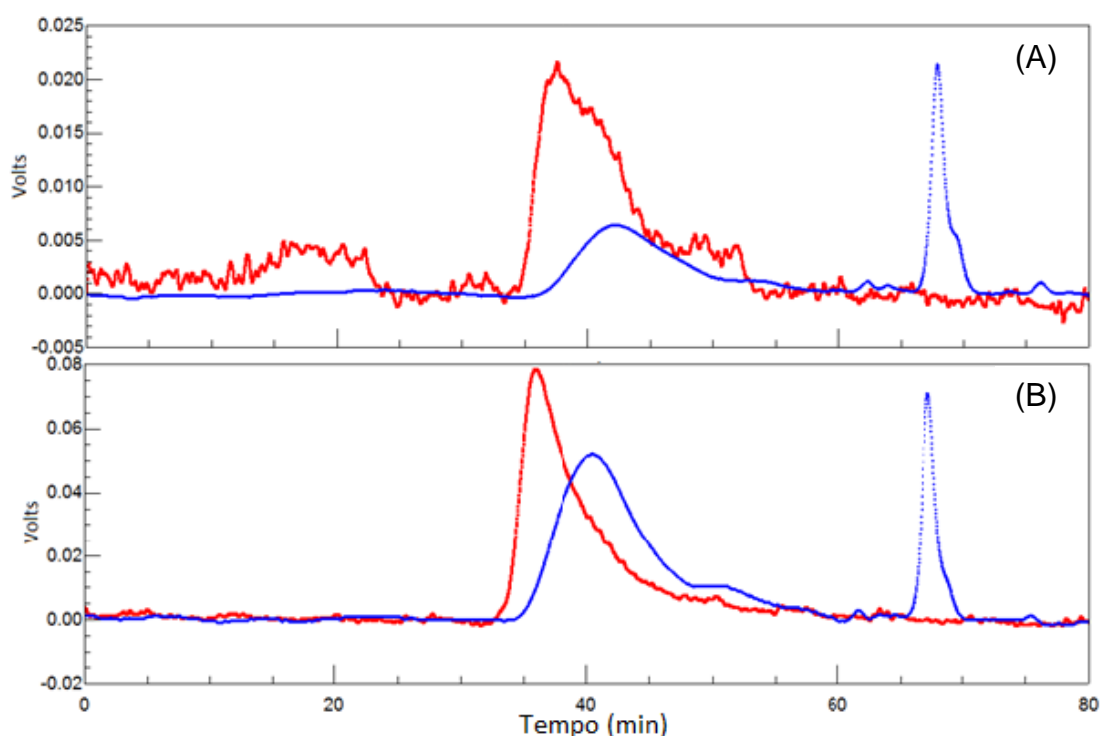


FIGURA 29 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC – MALLS DAS FRAÇÕES DOS PERICARPOS CLARO E ESCURO. (A) AMOSTRA PCq(UP); (B) PEq(UP)

A partir dos cromatogramas representados nas Figuras 27, 28 e 29, relativas às análises dos exocarpos, mesocarpos externos e pericarpos, respectivamente, após a última diálise contra água ultra pura, é possível verificar que, após fracionamento, não se apresentam homogêneas e mantêm seu caráter polidisperso. As amostras dos exocarpos e dos mesocarpos externos apresentaram o mesmo pico eluído entre 37 e 47 min, detectado pelo detector de IR.

O cromatograma da fração R é apresentado na Figura 30 e seu perfil heterogêneo e polidisperso é igual aos apresentados pelas amostras MEf, MEq, PCq e PEq previamente às diálises, caracterizados pela presença de picos largos eluindo entre 37 e 45 min e 50 e 70 min, detectados pelo detector IR. No HPSEC da fração R também é detectada a presença de um polissacarídeo de elevada massa molecular pelo detector MALLS eluindo entre 35 e 40 min. O pico intenso identificado em 70 min é característico do solvente utilizado na análise (NaNO_2).

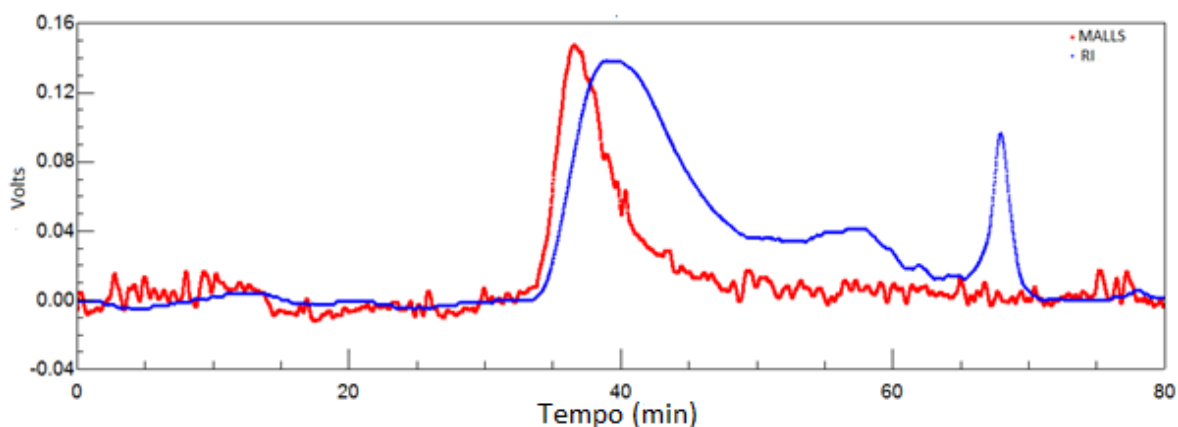


FIGURA 30 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC – MALLS DA FRAÇÃO R

Este tipo de perfil é esperado para pectinas, uma vez que esta é composta por açúcares diversos, constituintes de cadeias laterais de variados tamanhos, como a encontrada nas frações deste trabalho. Estes perfis são semelhantes aos encontrados por Hokputsa *et al* (2004) para pectinas de hastes de *Acanthus ebracteatus*, por Vriesmann e Petkowicz (2009) para pectinas da polpa de cupuaçu e cascas de cacau (VRIESMANN, AMBONI e PETKOWICZ, 2011).

Dada esta natureza heterogênea das pectinas, que apresentam regiões lineares, cadeias laterais ramificadas, variações inter e intramolecular, bem como diferentes padrões de distribuição dos grupos metil-éster ao longo da molécula, a determinação de sua massa molecular é extremamente difícil (KIM; TENG; WICKER, 2005).

4.5 Ultra-filtração da fração polissacarídica

100 mg da fração R foi submetida à ultra-filtração utilizando primeiramente uma membrana de 1000 KDa. O eluído desta primeira etapa foi seqüencialmente ultra-filtrado em membrana de 500 KDa e, por último, em membrana de 300 KDa, conforme descrito na seção 3.6.

Os processos de ultra-filtração são utilizados na tentativa de se isolar inúmeros componentes moleculares por tamanho. Neste trabalho, o procedimento

foi utilizado com o intuito de isolar as pectinas de moléculas menores, de modo a obter o polissacarídeo puro.

O material que ficou retido após a primeira filtração em membrana de 1000 KDa (R1000) foi analisado quanto ao seu rendimento, teores de açúcares totais e ácidos urônicos (Tabela 9), RMN de ^{13}C (Figura 31) e quanto à sua homogeneidade por HPSEC-MALLS (Figura 32).

TABELA 9 - RENDIMENTO, TEORES DE AÇÚCARES TOTAIS E URÔNICOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA^a DA FRAÇÃO R SUBMETIDA À ULTRA-FILTRAÇÃO EM MEMBRANA DE 1000 kDa

Amostra	Rendimento após ultra- filtração (%)	Açúcares totais (%) ^b	Ácidos urônicos ^c (%)*	Rha (%)	Fuc (%)	Ara (%)	Xyl (%)	Man (%)	Gal (%)	Glc (%)
R	-	57,2	41,0	6,8	2,1	16,0	3,0	1,4	23,5	6,2
R1000	65,5	65,4	26,9	7,3	0,8	26,5	4	1,9	27,6	6,1

a: determinado por GC-MS, mol%. Percentagem calculada sobre teor de açúcares neutros (dados não demonstrados).

b: determinado por método colorimétrico (Dubois *et al.*, 1956) utilizando padrão de GalA:Ara (1:1)

c: determinado por método colorimétrico (Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991), em relação ao teor de açúcares neutros.

O eluído na membrana de 300 kDa apresentou um rendimento de 11,9% que, somado ao rendimento de 65,5% obtido para a fração R1000, totalizou 77,4 % de recuperação da amostra. Logo, 22,5% da amostra representa o material retido nas membranas de 500 e 300 kDa. Este baixo rendimento impossibilitou a utilização destas frações nas análises químicas e nos leva a concluir que o tamanho das moléculas do eluído na membrana de 1000 kDa eram menores que 300 kDa.

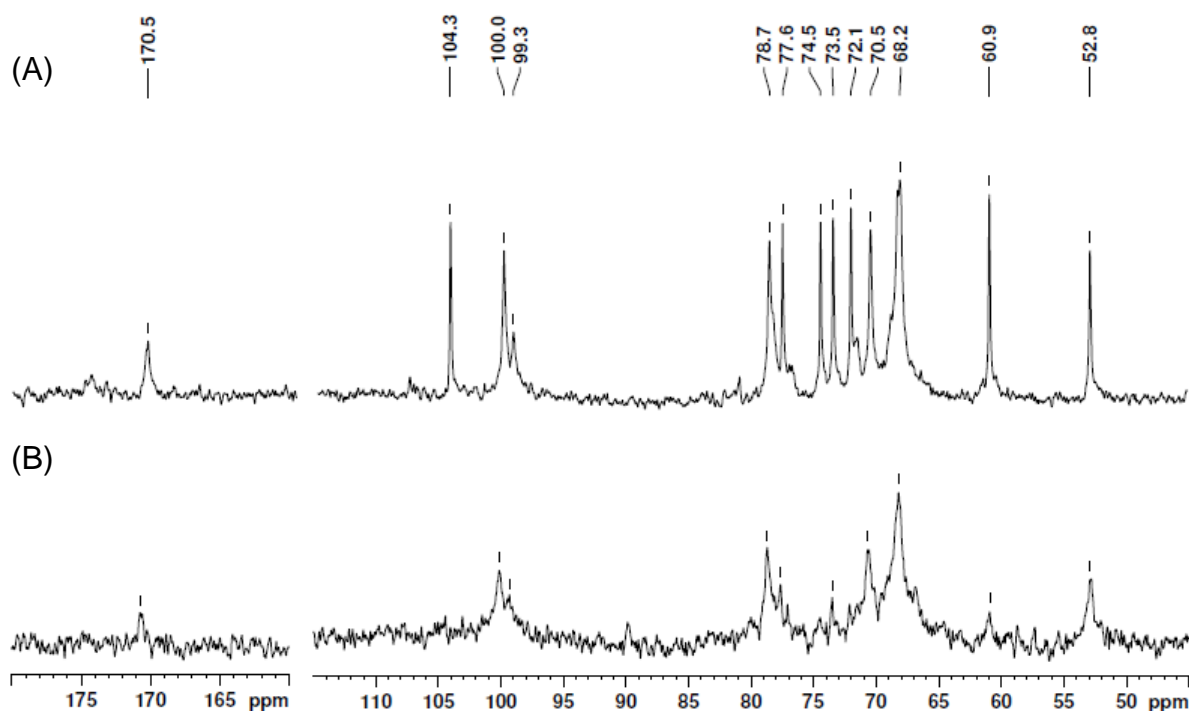


FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO R: (A) ESPECTRO DA FRAÇÃO NATIVA; (B) ESPECTRO DA FRAÇÃO SUBMETIDA À ULTRAFILTRAÇÃO

Apesar do alto teor de açúcares neutros, conforme pode ser observado na Tabela 9, no espectro de RMN da fração R1000 (Figura 31) apenas os deslocamentos químicos correspondentes ao C-1 (100 e 99.3 ppm), C-2 (68.2 ppm), C-3 (70.5 ppm), C-4 (78.7), C-6 (170.5 ppm) e ao grupo metoxil (52.8 ppm) da α -D-GalpA-(1 \rightarrow 4) são evidentes.

Dada a discrepância entre os resultados da composição monossacarídica e os de RMN de ^{13}C , evidencia-se a necessidade de mais experimentos no que concerne a estrutura da fração ultra-filtrada para resultados mais coerentes.

A análise por HPSEC – MALLS, cujo cromatograma é mostrado na Figura 32, revelou, para a fração R1000, o mesmo perfil heterogêneo e polidisperso exibido na fração nativa (R). Entretanto após a ultra-filtração, observa-se o desaparecimento do pico eluído em 55 min detectado pelo IR na fração nativa e um cromatograma mais definido e homogêneo em relação a esta.

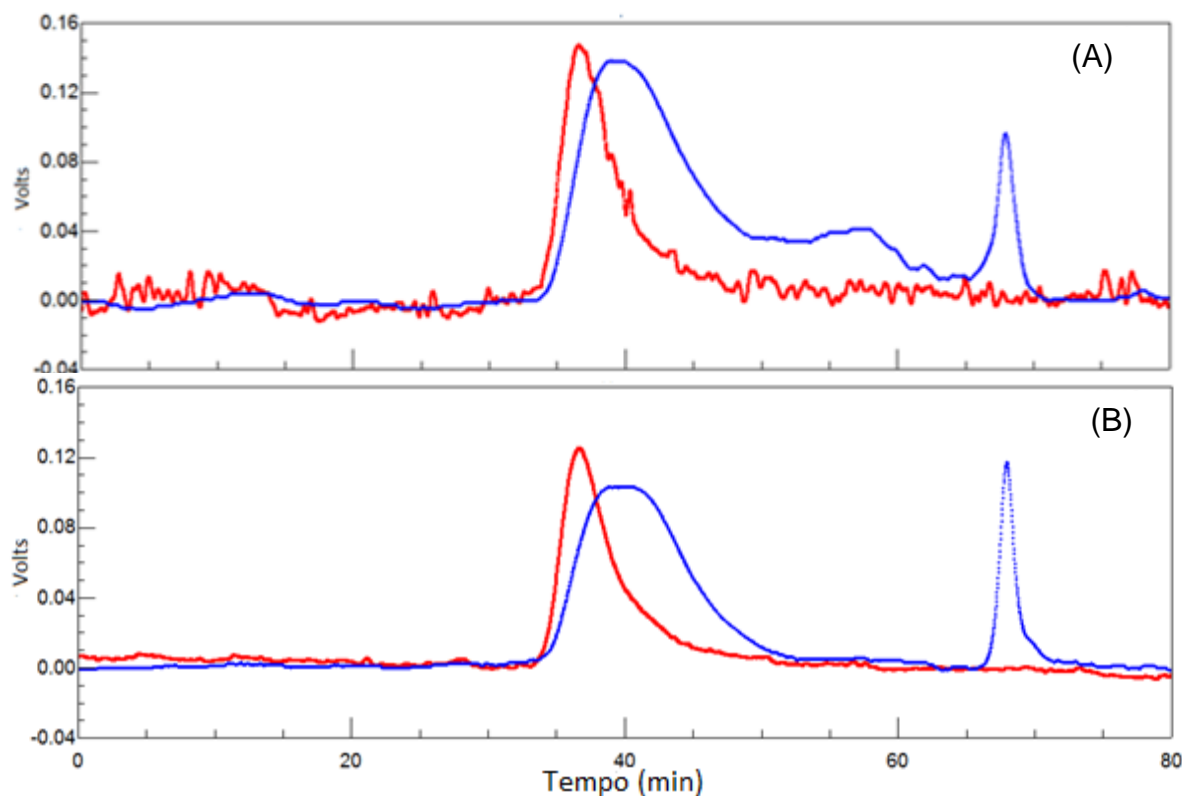


FIGURA 32 - CROMATOGRAMA DE HPSEC - MALLS DA FRAÇÃO R. (A) FRAÇÃO NATIVA; (B) FRAÇÃO SUBMETIDA À ULTRA-FILTRAÇÃO

A presença majoritária de açúcares neutros nesta fração nos leva a inferir a presença de uma pectina rica em polissacarídeos neutros. A força de um gel de pectina depende da formação de zonas de junção intermoleculares de diferentes cadeias de homogalacturonanas, o que ocorre nas *smooth* regions. A resistência à tração depende do número destas zonas por unidade molecular (VORAGEN *et al.*, 1995; McCANN e ROBERTS, 1996). A grande quantidade de polissacarídeos neutros dificulta a formação destas zonas de junção, o que enfraquece o gel e acaba por desconsiderar o valor útil da pectina enquanto aditivo para promover espessamento. Portanto, para as pectinas deste trabalho, o processo de ultra-filtração mostrou-se menos adequado do que a diálise para a obtenção de uma pectina com melhor potencial de utilização comercial.

4.6 Carboxi-redução da fração polissacarídica R

Previamente ao processo de carboxi-redução, a fração R foi saponificada, de forma a liberar os ésteres de metil dos grupos carboxílicos dos ácidos urônicos, para permitir a reação com a carbodiimida. O processo foi acompanhado por RMN de ^{13}C e o espectro obtido da fração saponificada está representado na Figura 33.

A partir da comparação com o espectro da fração nativa (Figura 33A), observa-se no espectro da amostra saponificada (Figura 33B) o deslocamento do pico em 170.5 ppm, correspondente ao C-6 de unidades de $\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow\text{4)}$ esterificadas com metoxil, para 174.8 ppm, sinal característico de não esterificadas (ácidos urônicos). De forma semelhante, o deslocamento químico do grupo metoxil em 52.8 ppm desaparece, bem como o sinal em 100 ppm, relativo ao C-1 de unidades esterificadas. Ao mesmo tempo, o pico em 99.3 ppm de C-1 de unidades de - esterificadas aumentou, o que os leva a concluir que o processo de saponificação foi eficaz.

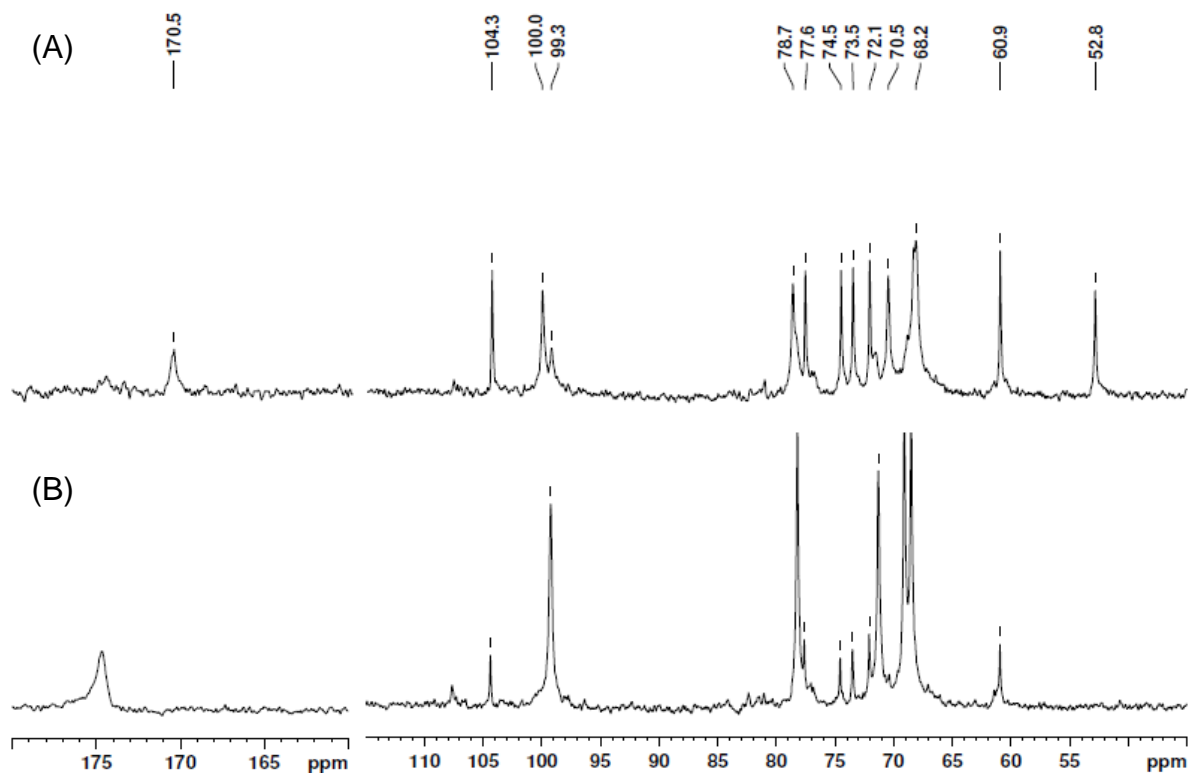


FIGURA 33 (A)34 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO R: (A) ESPECTRO DA FRAÇÃO NATIVA; (B) ESPECTRO DA FRAÇÃO SAPONIFICADA

Com os grupos carboxílicos livres, o processo de carboxi-redução pode ser efetivado com sucesso e a fração R carboxi-reduzida (R-CR) foi analisada quanto à eficácia na redução no teor de ácidos urônicos, composição monossacarídica e RMN, conforme descrito na tabela 10 e na figura 36.

Conforme pode-se notar na tabela 10, em relação à fração original houve uma diminuição de 70% no montante de ácidos urônicos após a redução dos grupos carboxílicos, o que refletiu no aumento de 40% no teor de galactose. Estes dados nos permitem concluir que as frações polissacarídicas de *Caryocar brasiliense* são constituídas principalmente por ácido galacturônico e, portanto, tratam-se majoritariamente de pectinas.

TABELA 10 - RENDIMENTO, TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA^a DA FRAÇÃO R SUBMETIDA A CARBOXI-REDUÇÃO

Material	Amostra	Rendimento (%)	Ácidos urônico s ^b (%)*	Rha (%)	Fuc (%)	Ara (%)	Xyl (%)	Man (%)	Gal (%)	Glc (%)
Exocarpo	R	-	41,0	6,8	2,1	16,0	3,0	1,4	23,5	6,2
escuro	R(CR)	84	15,0	4,2	0,5	11,8	1,6	0,7	62,6	3,6

a: determinado por GC-MS, mol%. Percentagem calculada sobre teor de açúcares neutros (dados não demonstrados).

b: determinado por método colorimétrico (Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991), em relação ao teor de açúcares neutros.

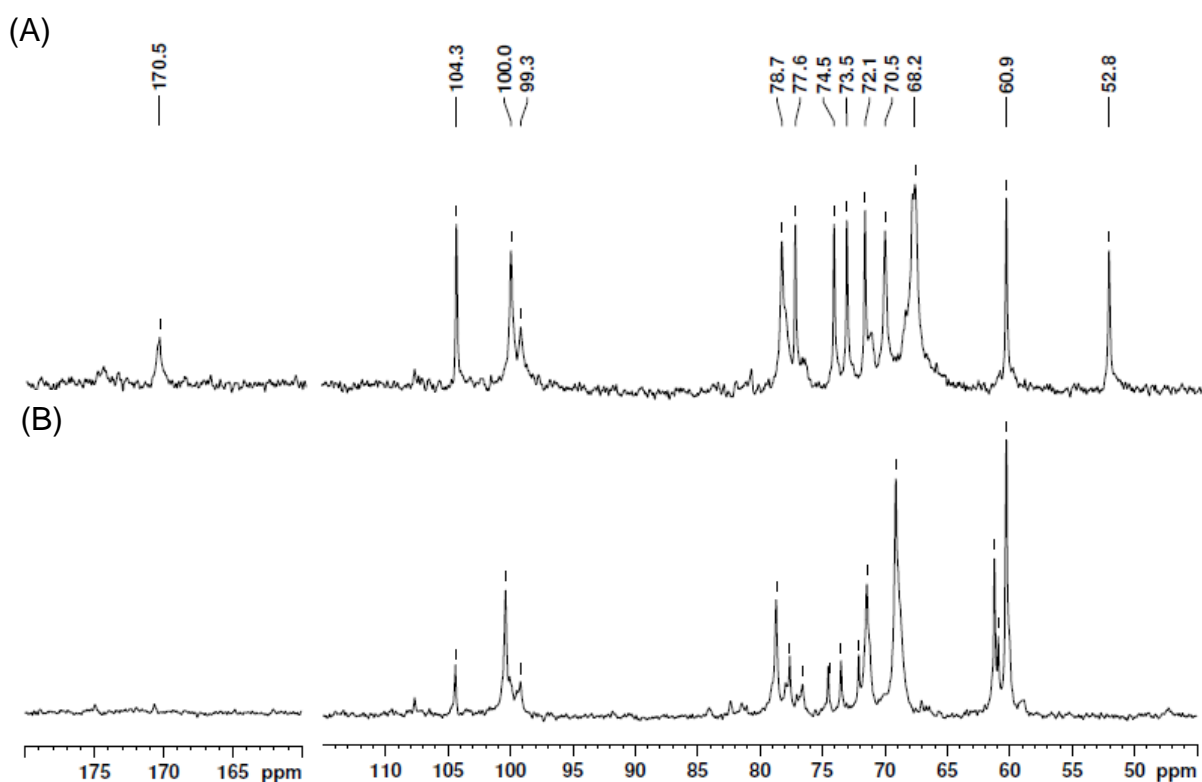


FIGURA 3435 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO R: (A) ESPECTRO DA FRAÇÃO NATIVA; (B) ESPECTRO DA FRAÇÃO SAPONIFICADA E CARBOXI-REDUZIDA

No espectro apresentado na figura 34(B) nota-se o aparecimento de um deslocamento em 61.2 ppm consistente com a transformação das unidades de α -D-GalpA em α -D-Galp. O sinal em 100,1 ppm correspondente ao C-1 de α -D-GalpA sofreu deslocamento para 100,5 ppm. Uma vez que o objetivo do método de Stone e Anderson (1985) é reduzir as unidades de ácidos urônicos às suas correspondentes unidades neutras, um aumento no teor de galactose é esperado.

4.7 Análises Reológicas

4.7.1 Comportamento em fluxo estacionário de polissacarídeos provenientes de *Caryocar brasiliense*

As soluções de polissacarídeos de *Caryocar brasiliense* foram examinadas quanto ao seu comportamento em fluxo contínuo em resposta à taxa de cisalhamento $\dot{\gamma}$ variando entre 0 – 100 s⁻¹. As Figuras 35 e 36 ilustram as curvas de fluxo e de viscosidade das amostras a 10, 25 e 35 g/L em solução aquosa, em NaCl 0,2 e 0,4 M e com sacarose a 50, 60 e 70% (p/p).

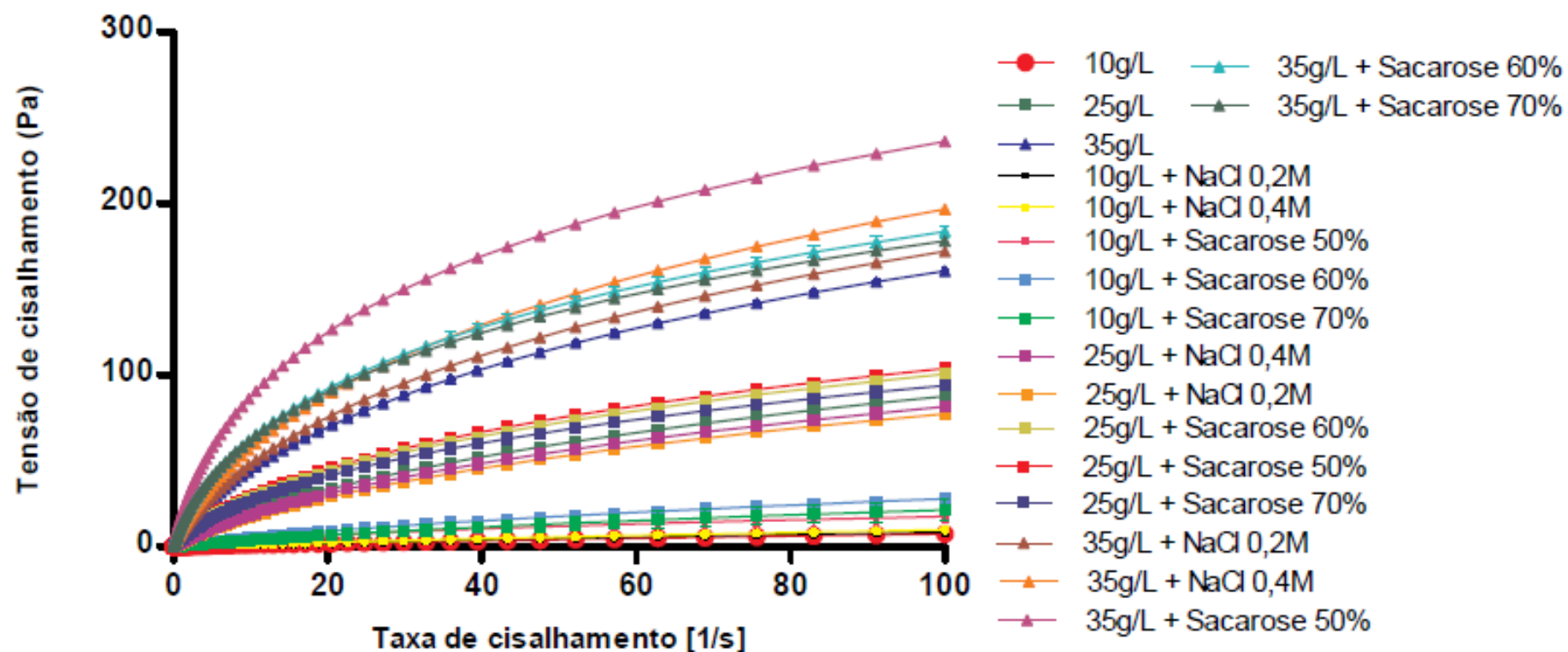


FIGURA 35 - CURVA DE FLUXO DAS SOLUÇÕES DE POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO R EM ÁGUA E ADICIONADAS DE NaCl 0,2 E 0,4 M E SACAROSE 50, 60 E 70% (P/P), 25°C

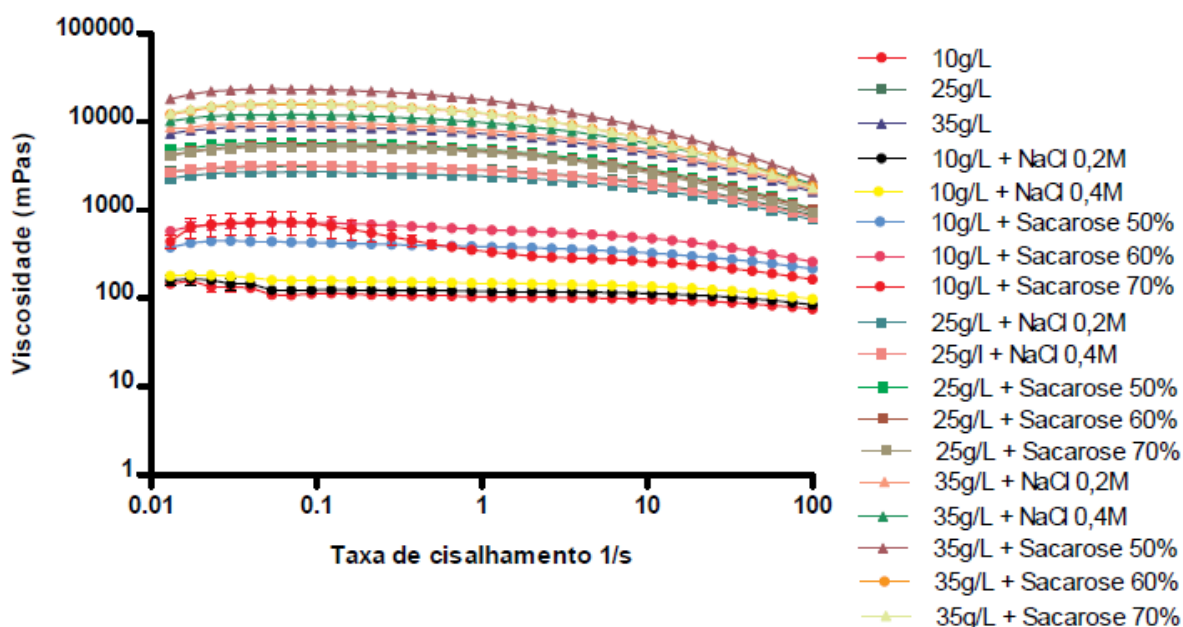


FIGURA 36 - CURVAS DE VISCOSIDADE A 25°C DAS SOLUÇÕES DE POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO R EM ÁGUA E ADICIONADAS DE NaCl 0,2 E 0,4 M E SACAROSE 50, 60 E 70% (P/P)

A representação gráfica das amostras nos leva a observar um comportamento quase newtoniano para as amostras a 10 g/L e para 10 g/L adicionadas de NaCl ou sacarose. As amostras a 25 e 35 g/L, apenas em água ou adicionadas de NaCl ou sacarose, apresentaram comportamento não-Newtoniano pseudopástico, onde a tensão de cisalhamento cresce desproporcionalmente com o aumento da taxa de cisalhamento e a viscosidade decresce conforme se aumenta a taxa de cisalhamento. Este comportamento foi também observado para pectinas obtidas de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) a 0,1% (SENGKHAMPARN *et al.*, 2010) e de abóbora em concentração de 3% (EVAGELIOU *et al.*, 2005) - concentração semelhante à de 35 g/L (3,5%) utilizada para as pectinas de pequi no presente trabalho, e de manga a 2% (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002).

A pseudoplasticidade de fluidos representa uma quebra irreversível na estrutura e diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, o

que depende particularmente da orientação das moléculas e partículas na direção do fluxo, superando o movimento browniano das moléculas. Este movimento as mantém em uma ordem interna irregular sob baixas tensões de cisalhamento. Quando o cisalhamento excede este efeito aleatório do movimento Browniano, a viscosidade cai drasticamente pela indução do alinhamento das moléculas na direção do fluxo (GLICKSMAN, 1984). Em taxas de cisalhamento extremamente altas, a viscosidade se aproxima a um nível finito constante (η_{∞}). Taxas de cisalhamento ainda maiores não são mais capazes de reduzir a viscosidade, pois o ótimo da orientação/alinhamento das moléculas foi alcançado (SCHRAMM, 2006).

O teor de acetilação das pectinas, DA, exerce um importante papel ao aumentar a viscosidade das soluções por promoverem associações hidrofóbicas (SENGKHAMPARN *et al.*, 2010). O baixo DA encontrado para as pectinas de *Caryocar brasiliense* pode explicar os valores reduzidos da viscosidade em relação à pectinas de cacau LM, mas de DA igual à 29% (VRIESMANN; AMBONI; PETKOWICZ, 2011).

Para avaliar os diferentes perfis apresentados pelas amostras na curva de fluxo, os modelos matemáticos propostos por Herschel-Bulkley, Bingham e Casson foram testados. Na tabela 11 são descritos os valores de R^2 obtidos para as amostras a 10, 25 e 35 g/L, tanto em água apenas quanto adicionadas de NaCl 0,2 e 0,4 M e sacarose 50, 60 e 70%.

TABELA 11 - COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO (R^2), OBTIDOS PELO AJUSTE DOS REOGRAMAS AOS MODELOS HERSCHEL-BULKLEY, BINGHAM E CASSON PARA A FRAÇÃO R *Caryocar brasiliense* EM ÁGUA E ADICIONADAS DE NaCl E SACAROSE A 25 °C

AMOSTRA	Herschel	Bingham	Casson
- Bulkley			
10 g/L	0,99	0,99	0,99
10 g/L + NaCl 0,2M	0,99	0,99	0,99
10 g/L + NaCl 0,4M	0,99	0,99	0,99
10 g/L + Sacarose 50%	0,99	0,99	0,99
10 g/L + Sacarose 60%	0,99	0,98	0,99
10 g/L + Sacarose 70%	0,99	0,99	0,99
25g/L	0,99	0,97	0,99
25g/L + NaCl 0,2 M	0,99	0,97	0,99
25g/L + NaCl 0,4 M	0,99	0,97	0,99
25g/L + Sacarose 50%	0,99	0,96	0,98
25g/L + Sacarose 60%	0,99	0,96	0,98
25g/L + Sacarose 70%	0,99	0,96	0,98
35g/L	0,99	0,96	0,98
35g/L + NaCl 0,2 M	0,99	0,96	0,98
35g/L + NaCl 0,4 M	0,99	0,95	0,98
35g/L + Sacarose 50%	0,99	0,93	0,96
35g/L + Sacarose 60%	0,99	0,94	0,97
35g/L + Sacarose 70%	0,99	0,93	0,96

Conforme a tabela 11, o modelo de Herschel-Bulkley apresentou os valores de R^2 mais próximos a 1 para todas as amostras e, desta forma, foi adotado para se avaliar os parâmetros K e n (Tabela 12). O modelo de Herschel-Bulkley descreve o comportamento em fluxo contínuo de diversos fluidos não-newtonianos ao relacionar a taxa de cisalhamento com a tensão de escoamento inicial (τ_0), o valor de consistência (K) e o índice de comportamento de fluxo (n) (MULLINEUX, 2008). Este modelo é amplamente utilizado para outras soluções de pectinas e muitos autores o utilizam para descrever parâmetros reológicos de soluções (MARCOTTE; HOSHAHILI; RAMASWAMY, 2001; SANTOS *et al.*, 2010; VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2009). A tabela 12 descreve estes parâmetros obtidos para as amostras analisadas.

TABELA 12 - ÍNDICE DE COMPORTAMENTO DE FLUXO (n) – ADIMENSIONAL, COEFICIENTE DE CONSISTÊNCIA (K) – Pa.s^n , TENSÃO DE ESCOAMENTO INICIAL (τ_0) – Pa E COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (R^2), OBTIDOS PELO AJUSTE DOS REOGRAMAS AO MODELO HERSCHEL-BULKLEY PARA AS SOLUÇÕES DE POLISSACARÍDEOS DE *Caryocar brasiliense* EM ÁGUA E ADICIONADAS DE NaCl E SACAROSE A 25 °C

Amostra	τ_0 (Pa)	K (Pa.s^n)	n
10 g/L	0	0,13	0,87
10 g/L + NaCl 0,2M	-0,02	0,16	0,63
10 g/L + NaCl 0,4M	-0,04	0,21	0,84
10 g/L + Sacarose 50%	-0,25	0,68	0,76
10 g/L + Sacarose 60%	-0,24	1,06	0,72
10 g/L + Sacarose 70%	-0,06	0,45	0,78
25 g/L	-1,26	5,09	0,63
25 g/L + NaCl 0,2M	-1,05	4,28	0,64
25 g/L + NaCl 0,4M	-1,20	4,93	0,62
25 g/L + Sacarose 50%	-2,35	8,85	0,55
25 g/L + Sacarose 60%	-2,17	8,39	0,55
25 g/L + Sacarose 70%	-2,11	8,13	0,54
35 g/L	-3,43	13,11	0,56
35 g/L + NaCl 0,2M	-3,82	14,64	0,55
35 g/L + NaCl 0,4M	-4,76	17,91	0,54
35 g/L + Sacarose 50%	-9,32	32,38	0,45
35 g/L + Sacarose 60%	-6,41	22,83	0,47
35 g/L + Sacarose 70%	-6,50	23,06	0,47

De acordo com a tabela 12 verifica-se que os valores de n permaneceram entre 0,0 e 1,0, caracterizando todas as amostras como pseudoplásticas. Uma vez que o comportamento pseudoplástico aumenta conforme o valor de n decresce, é possível observar um aumento na pseudoplasticidade com o aumento da concentração de polissacarídeos, uma vez que os valores de n diminuem de 0,87 para 0,63 e 0,56 nas amostras a 10, 25 e 35 g/L, respectivamente. Da mesma forma, o coeficiente de consistência da amostra (K) aumenta com o aumento da concentração dos polissacarídeos. Estes mesmos parâmetros foram afetados pela adição de cosolutos às soluções. Observa-se que as soluções 10 g/L + NaCl 0,2 e 0,4 M apresentam um aumento de 0,03 e 0,08 Pa.s^n , respectivamente, nos valores

de K com o aumento na concentração do sal, em relação à amostra solubilizada somente em água. O mesmo comportamento foi observado para as amostras 35 g/L + NaCl 0,2 e 0,4M, cujos valores de K aumentaram 1,53 e 4,8 Pa.sⁿ. Comportamento contrário foi observado para 25 g/L, uma vez que os valores de K, 4,28 Pa.sⁿ nas soluções em NaCl 0,2M e 4,93 Pa.sⁿ nas soluções em NaCl 0,4M, foram menores do que o valor de 5,09 Pa.sⁿ na amostra solubilizada apenas em água. O coeficiente n, entretanto, não se alterou significativamente com a adição de NaCl. A presença de sacarose nas soluções, por outro lado, elevou consideravelmente a consistência das amostras em relação à amostra apenas solubilizada em água, conforme indicam os valores de 0,68, 1,06 e 0,45 obtidos para as amostras 10 g/L + Sacarose 50, 60 e 70%, respectivamente, 8,85, 8,39 e 8,13 para as amostras 25 g/L + Sacarose 50, 60 e 70% e 32,38, 22,83 e 23,06 Pa.sⁿ para as 35 g/L + Sacarose nas mesmas concentrações. Contrariamente o observado com a adição de NaCl, a sacarose aumenta o comportamento pseudoplástico das soluções, conforme pode-se observar pela diminuição no coeficiente n. Resultado semelhante ao da fração 35 g/L + Sacarose 50% foi encontrado por Santos *et al.* (2010) para pectinas de polpa de gabioba sob condições semelhantes (concentração 30 g/L com adição de 70% de sacarose).

Entre as diferentes concentrações de sacarose não foi observada diferença nos valores de n. K diminuiu com o aumento da concentração de sacarose nas amostras a 25 g/L e 35 g/L. Nas amostras a 10 g/L, o aumento da concentração de sacarose de 50 para 60% levou a um aumento dos valores de K, no entanto, o aumento da concentração para 70% levou a uma redução no valor deste índice.

4.7.2 Análises Reológicas Oscilatórias Dinâmicas de polissacarídeos provenientes de *Caryocar brasiliense*

As análises oscilatórias dinâmicas são sensíveis à composição química e a estrutura física das amostras e foram realizadas com o intuito de conhecer as propriedades viscoelásticas e estruturais das soluções estudadas.

Previamente às análises oscilatórias as amostras foram submetidas à varreduras de tensão para a determinação da região viscoelástica linear (RVL). A RVL é conhecida por ser a região onde há uma relação linear entre a deformação sofrida e a tensão aplicada ao material, ou seja, a deformação é, a qualquer momento, proporcional à tensão aplicada e não há alterações da estrutura original da amostra (SCHRAMM, 2006). Para esta determinação, portanto, as varreduras de tensão foram realizadas no intervalo de 1 a 10 Pa com frequência fixa de 1 Hz. A partir da determinação da região viscoelástica linear e seleção da tensão em 2 Pa, foi realizada a varredura de frequência da fração polissacarídica R.

Para as análises em sistema oscilatório dinâmico foram escolhidas as amostras com maior concentração em polissacarídeo (35 g/L) e as misturas com os co-solutos NaCl e Sacarose. Além destas foram selecionadas as amostras com concentração de 10 e 25 g/L de polissacarídeo com 50% de sacarose. A escolha destas amostras está baseada nos resultados das curvas de fluxo, pelas quais as amostras foram caracterizadas com comportamento pseudoplástico (Figura 35).

As Figuras 37 e 38 ilustram a variação de G' e G'' (espectro mecânico) em função da frequência para as amostras com concentração de 35 g/L de polissacarídeo, adicionadas de NaCl e Sacarose, respectivamente, na temperatura de 25 °C.

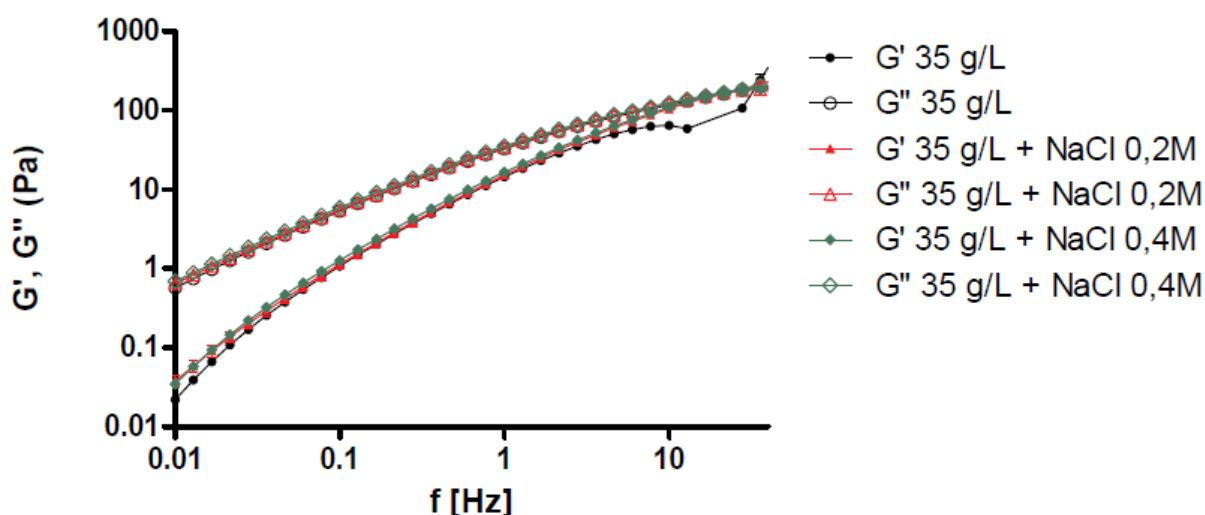


FIGURA 37 - EFEITO DA ADIÇÃO DE NaCl 0,2 E 0,4 M NOS MÓDULOS G' E G'' DA FRAÇÃO R A 35 g/L

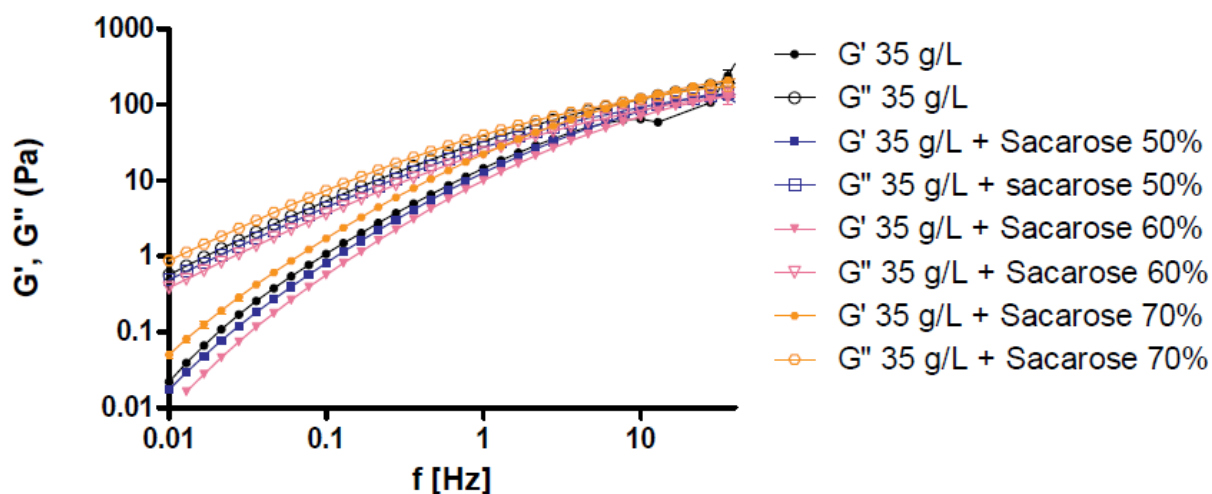


FIGURA 38 - EFEITO DA ADIÇÃO DE SACAROSE A 50, 60 E 70% (P/P) NOS MÓDULOS G' E G'' DA FRAÇÃO R A 35 g/L

Conforme se pode observar nas Figura 37 e 38, em todas as amostras os módulos G' e G'' mostram-se dependentes da frequência em toda a faixa analisada. Todas as frações apresentaram predomínio de caráter viscoso, onde $G'' > G'$, na faixa de frequência de 0,01 a 10 Hz. Com o aumento da frequência, G' e G'' aumentam, como consequência do aumento do número de zonas junção e G' aumenta mais acentuadamente do que G'' , caracterizando o aumento do caráter sólido em função do aumento das interações entre cadeias de moléculas de pectina.

Este perfil é característico de uma solução concentrada (MORRIS, 1995). Este mesmo perfil foi encontrado por Sengkhamparn *et al.* (2010) para pectinas de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) extraídas em água de quiabo e por Norziah *et al.* (2001) para pectinas de frutas Pomelo (*Citrus grandis*). Estes últimos, ao adicionarem Ca^{2+} às soluções de caráter viscoso, contendo apenas pectinas e sacarose, obtiveram géis com predominância de G' sobre G'' , sugerindo a importância de sais divalentes mesmo em soluções de pectinas HM, embora a influência do íon na força dos géis depende da natureza da pectina (NORZIAH *et al.*, 2001).

A tabela 13 apresenta os valores de G' e G'' das amostras a 1 e 10 Hz.

TABELA 13 - MÉDIA DOS VALORES DE G' E G'' MEDIDOS A 1 E 10 HZ PARA AS SOLUÇÕES DE POLISSACARÍDEOS DE *Caryocar brasiliense* EM ÁGUA E ADICIONADAS DE NaCl E SACAROSE A 25 °C

Amostra	1 Hz		10 Hz	
	G'	G''	G'	G''
35 g/L + Sacarose 50%	15,4 +- 0,3	31,0 +- 0,2	93,3 +- 0,2	100,6 +- 0,1
35 g/L + Sacarose 60%	10,0 +- 0,02	23,3 +- 0,01	70,0 +- 0,01	83,5 +- 0,01
35 g/L + Sacarose 70%	22,2 +- 0,1	40,1 +- 0,06	120,7 +- 0,06	119,5 +- 0,03
35 g/L	14,4 +- 0,1	28,7 +- 0,11	64,6	117,7
35 g/L + NaCl 0,2M	15,2 +- 0,2	34,1 +- 0,1	104,2 +- 0,1	122,4 +- 0,1
35 g/L + NaCl 0,4M	16,5 +- 0,06	35,3 +- 0,05	108,1 +- 0,05	123,5 +- 0,04

De acordo com os valores apresentados na Tabela 13 pode-se observar que os valores de G' e G'' são maiores para as amostras com 70% de sacarose. O módulo de armazenamento (G') é particularmente afetado pela concentração de sólidos solúveis e, conseqüentemente, os valores de G' aumentam à medida que maiores concentrações de sacarose ou NaCl são adicionados. O acréscimo de NaCl a 0,2 e 0,4 M na amostra a 35g/L, representado mais detalhadamente na Figura 37 e na tabela 13, refletiu num aumento discreto nos módulos G' e G'' em relação à amostra solubilizada apenas em água. As amostras a 35 g/L contendo 60% de sacarose apresentaram valores de G' e G'' visualmente menores em relação à amostra contendo apenas polissacarídeo e água, o que nos leva a crer que estas concentrações de açúcar afetaram negativamente a rede tridimensional de moléculas de polissacarídeo. Entretanto, a adição de sacarose a 70% gerou um aumento gradual e mais substancial em ambos os módulos, conforme se pode visualizar na Figura 38 e na tabela 13, demonstrando ser a melhor concentração de sacarose dentre as três testadas para promover uma solução com caráter mais sólido, embora mesmo nesta concentração de sacarose não ocorra a formação de gel. Sharma, Liptay e Le Maguer (1998), Santos (2010) e Vriesmann, Silveira e Petkowicz (2009), verificaram que a força dos géis de pectina HM eleva-se com o aumento da concentração de sacarose. Com o aumento da percentagem de açúcar no meio ocorre diminuição da atividade de água, o que favorece a formação de zonas de junção intermoleculares, o que aumenta a resistência da solução

(VORAGEN *et al.*, 1995). Sendo assim, amostras isentas ou com baixos teores de sólidos solúveis são mais sensíveis às variações de frequência, o que indica que sua estrutura viscoelástica é mais frágil (VRIESMANN, SILVEIRA, PETKOWICZ 2009).

Em alguns polímeros biológicos ocorre uma transição de líquido viscoso (sol) para um sistema relativamente elástico (gel), caracterizado pelo cruzamento (*crossover*) dos módulos de armazenamento G' e de perda G'' , que pode ser alcançado pelo aumento nas frequências angulares empregadas ou na concentração de pectina (ALONSO-MOUGÁN *et al.*, 2002). A transição sol-gel é um fenômeno importante, uma vez que as propriedades viscoelásticas aumentam substancialmente durante a transição (NORZIAH *et al.*, 2001). Nas amostras 10 g/L + Sacarose 50% (Figura 39) o *crossover* é evidenciado em aproximadamente 10 Hz, entretanto, com o aumento da frequência, ocorre cisalhamento da amostra, com ruptura da rede tridimensional, conforme pode ser observado na região da Figura 39, onde os gráficos se misturam desordenadamente. Nas amostras a 25 g/L + Sacarose 50% e 35 g/L + NaCl e sacarose o *crossover* ocorre em aproximadamente 30 Hz, a partir de onde $G' > G''$.

A resistência de soluções de pectinas HM à variações na frequência é aumentada quando se eleva a concentração do polissacarídeo e também pelo aumento do peso molecular (FRAEYE *et al.*, 2009). A figura 42 ilustra o efeito do aumento da concentração de polissacarídeo, em uma concentração fixa em 50% de sacarose (p/p).

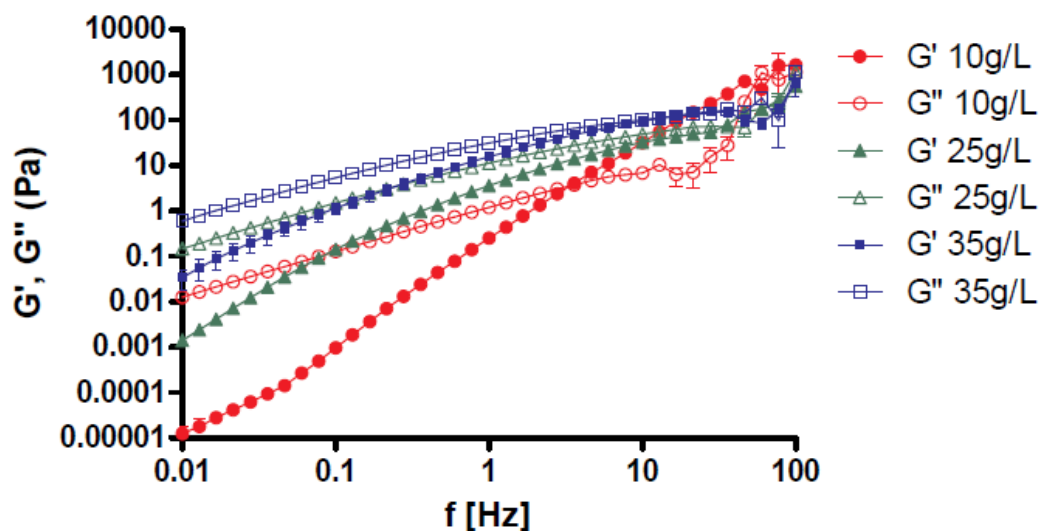


FIGURA 39 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO NO COMPORTAMENTO DAS AMOSTRAS DA FRAÇÃO R A 10, 25 E 35 G/L ADICIONADA DE 50 DE SACAROSE (P/P) FRENTE ÀS VARIAÇÕES DE FREQUENCIA

É nítido o efeito do aumento da concentração de polissacarídeo na intensificação dos módulos G' e G'' . Este efeito ocorre graças a um aumento na densidade de entrelaçamentos entre cadeias moleculares com o acréscimo na quantidade de moléculas. Como resultado, a liberdade de movimento das cadeias individuais é progressivamente restringida e, conseqüentemente, o módulo G' é aumentado. (BOURBON *et al.*, 2010). O aumento em ambos os módulos com o acréscimo na concentração de polissacarídeo também foi observado por Brandão e Andrade (1999) para pectinas cítricas comerciais com alto DE, por Norziah *et al.* (2001) para pectinas de frutas “Pomelo” (*Citrus grandis*) e Fraeye *et al.* (2009) para pectinas comerciais de maçã.

Para pectinas, dada sua natureza molecular, a formação de um gel forte é esperado (VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2010b; HAMINIUK *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2010). A obtenção de uma solução concentrada ao invés de um gel forte pode ter muitas explicações. Um ponto importante a se considerar neste quesito é a falta de pureza da molécula de pectina, uma vez que a amostra utilizada para os experimentos reológicos não foi purificada e toda a teoria acerca do processo de geleificação de pectinas contempla moléculas livres de contaminantes. A grande quantidade de moléculas de baixo peso molecular presente na amostra,

como pode ser evidenciado nos experimentos de HPSEC – MALLS (Figura 32), pode ter influenciado os dados reológicos, evidenciando a necessidade de maior conhecimento sobre estes constituintes e a causa de sua influência na força da solução.

Outros fatores podem explicar o comportamento das amostras analisadas frente às variações de frequência. Pelo menos duas zonas de junção por cadeia são requeridas para obter uma rede tridimensional efetiva, que garante a estrutura e a resistência da solução à tensão (LUZIO, CAMERON, 2008; FRAEYE *et al.*, 2009). Assim, o tamanho da molécula e o número de *smooth regions*, onde não há cadeias laterais e zonas de junção são formadas, podem afetar significativamente o caráter sólido ($G' > G''$) da solução. De outra forma, não apenas o grau de metoxilação (DM), mas a distribuição dos grupos metoxil na molécula podem influenciar as qualidades físicas de soluções de pectinas, uma vez que pectinas com distribuição de grupos metoxil em bloco exibem um caráter mais semelhante ao de gel, comparados com pectinas com distribuição randômica destes grupos (FRAEYE *et al.*, 2009)

Fatores externos à molécula, como o pH, também podem ter influenciado os resultados. Evageliou, Richardson e Morris (2000), ao avaliar o efeito do pH nos módulos G' e G'' , verificaram uma acentuada redução em ambos os módulos à medida que o pH é aumentado acima do pK_a das unidades de ácido galacturônico (~3,4). O pH das soluções testadas no presente trabalho foi de 4 a 4,5, uma vez que o pH não foi corrigido. Em pH acima de 4,7, muito próximo ao obtido para as soluções deste trabalho, há apenas uma auto-associação de cadeias de pectinas suficientes para garantir uma rede contínua (EVAGELIOU; RICHARDSON; MORRIS, 2000). Entretanto, experimentos concernindo a variação de pH especificamente nos polissacarídeos de *Caryocar brasiliense* devem ser realizados a fim de se concluir este efeito no comportamento destes polissacarídeos quando em solução.

A partir dos resultados apresentados, observa-se que as soluções formadas pelos polissacarídeos extraídos de casca de Pequi não formam géis de pectinas, conforme esperado, gerando um perfil de solução concentrada em todas as condições analisadas. Revelou-se, a partir destes experimentos, a importância da concentração de polissacarídeo e sacarose na estabilidade e no aumento do caráter

sólido das amostras, uma vez que o módulo G' foi maior nas amostras contendo maior teor do açúcar. A presença de NaCl não gerou alteração significativa em ambos os módulos (G' e G'').

Evidencia-se, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, a importância de mais estudos concernindo fatores estruturais da molécula e físicos das soluções para melhor compreensão do comportamento das soluções estudadas.

4.7.3 Análises Dinâmicas Termomecânicas

Com a finalidade de observar o efeito da temperatura sob a estabilidade térmica das soluções de polissacarídeos de *Caryocar brasiliense*, foi realizado o estudo da influência da temperatura nos módulos elástico G' e viscoso G'' . Para isso, as amostras 35g/L, 35g/L + NaCl 0,2M e 35g/L + Sacarose 50% foram submetidas às rampas de temperatura conforme descrito em 3.11.5.

Para determinar a dependência modular em função da temperatura, a frequência, tensão e a taxa de aquecimento ou resfriamento foram mantidos constantes em 1 Hz, 2 Pa e 3°C / min, respectivamente. Para estas análises foram selecionadas as amostras 35g/L, 35g/L + NaCl 0,2M e 35g/L + sacarose 50% por representarem três tipos diferentes de amostras.

A figura 40 demonstra a fragilidade da estrutura interna frente às variações de temperatura, tendo em vista as bruscas alterações no módulo de armazenamento (G').

Ocorre uma acentuada redução dos valores de G' durante o início do aquecimento em todas as amostras avaliadas e, a partir de 60°C a amostra contendo NaCl 0,2M recupera sua estrutura e os valores do módulo retornam aos valores iniciais, em aproximadamente 10°C. O mesmo ocorre com a amostra solubilizada apenas em água a partir de 80°C. Temperaturas superiores a 75°C e 90°C, entretanto, voltam a desestabilizar a rede molecular das amostras 35g/L + NaCl 0,2M e 25g/L, respectivamente, o que ocasiona uma queda nos valores de G' destas frações. Com o resfriamento a estrutura original não é recuperada e o módulo G' permanece abaixo dos valores iniciais no final do ciclo aquecimento-resfriamento.

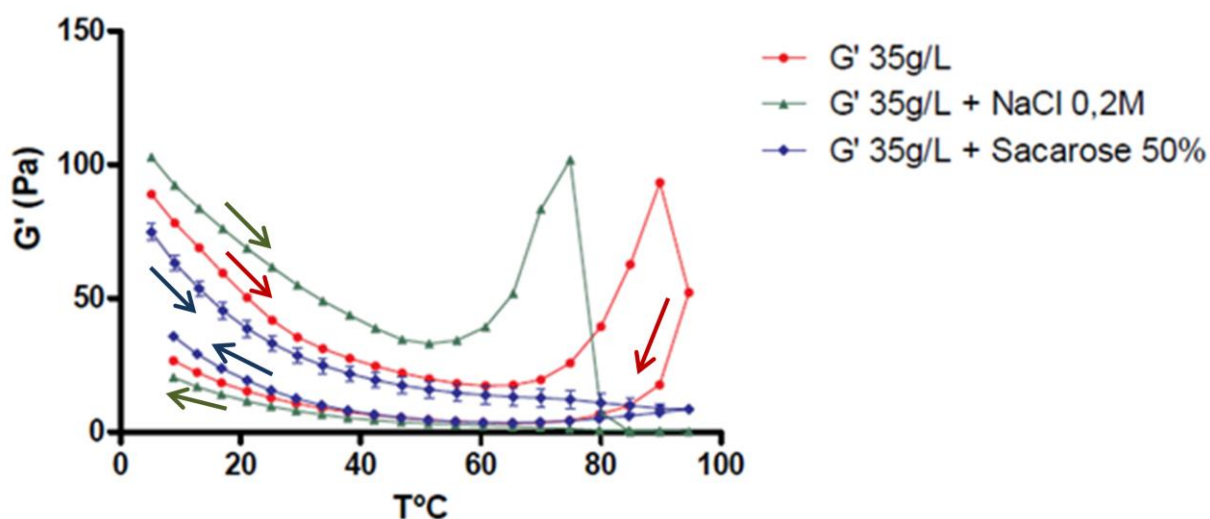


FIGURA 40 - VARIAÇÃO NO MÓDULO G' DAS AMOSTRAS 35G/L E 35G/L ADICIONADAS DE NaCl 0,2 M E SACAROSE 50% DURANTE AQUECIMENTO DE 5°C A 95°C E POSTERIOR RESFRIAMENTO DE 95°C A 5°C.

A amostra contendo 50% de sacarose mostrou-se mais lábil ao aumento da temperatura em relação às contendo apenas o polissacarídeo e polissacarídeo mais NaCl. Com o resfriamento, o módulo G' da amostra contendo este açúcar apresenta valores ligeiramente superiores aos demais, demonstrando que, após variação térmica, a amostra apresentou maior caráter sólido do que no início do experimento, demonstrando que novas associações moleculares podem ocorrer durante o aquecimento, alterando a solução e revelando sua importância como um agente estabilizador da estrutura.

Os processos tradicionais de fabricação de geléias se utilizam da adição de açúcar sob cocção a alta temperatura com posterior resfriamento para obtenção de uma textura mais espessa do produto final. Durante o processo de aquecimento, ocorre uma diminuição no teor de água livre no sistema, o que aumenta a concentração e favorece maior contato entre as cadeias de polissacarídeos. Após o resfriamento, a energia térmica do sistema diminui, favorecendo a aproximação das cadeias moleculares e sua interação, que é de fundamental importância para garantir a força da solução (VORAGEN *et al.*, 1995). Estes dados comprovam a eficácia destes processos há muito utilizados pela civilização na culinária e na

tecnologia de alimentos, mesmo antes do conhecimento da bioquímica e biofísica deste processo.

As Figuras 41, 42 e 43 ilustram a variação de ambos os módulos, G' e G'' , das amostras 35g/L, 35g/L + NaCl 0,2 M e 35g/L + Sacarose 50%, respectivamente.

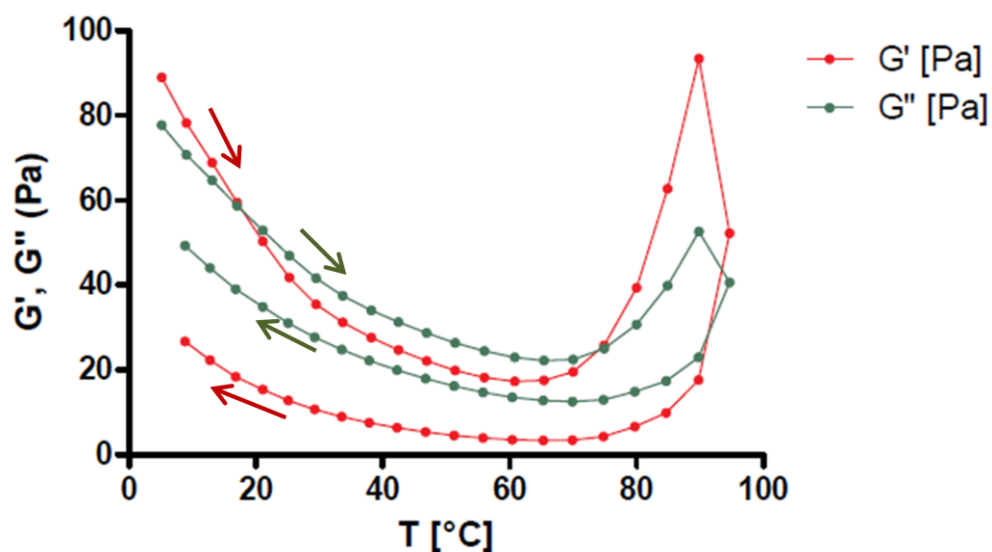


FIGURA 41 - VARIAÇÃO NOS MÓDULOS G' E G'' DA AMOSTRA 35G/L DURANTE AQUECIMENTO DE 5°C A 95°C E POSTERIOR RESFRIAMENTO DE 95°C A 5°C

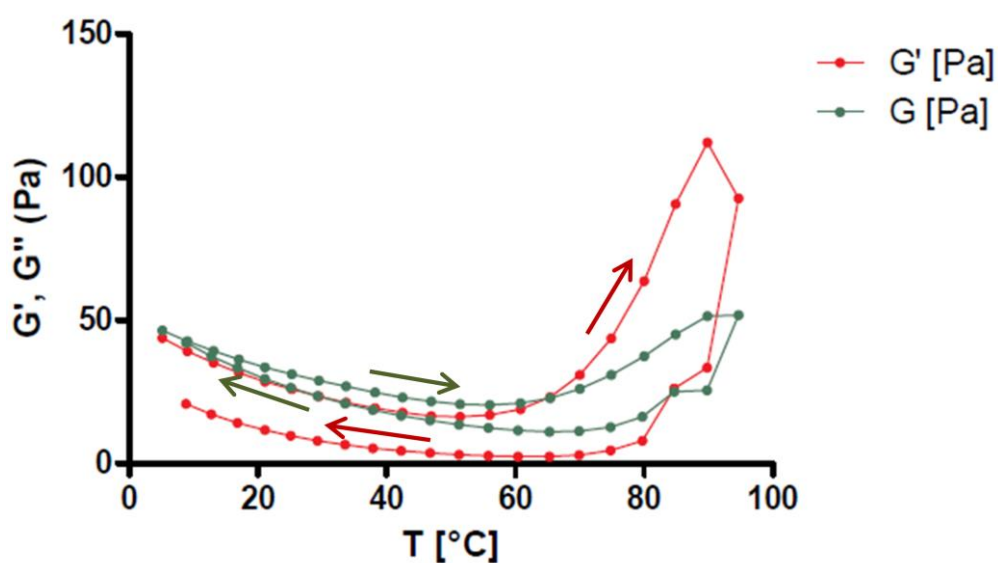


FIGURA 42 - VARIAÇÃO NOS MÓDULOS G' E G'' DA AMOSTRA 35G/L ADICIONADA DE NaCl 0,2 M DURANTE AQUECIMENTO DE 5°C A 95°C E POSTERIOR RESFRIAMENTO DE 95°C A 5°C

Observa-se que, antes de atingir 20°C e após aproximadamente 75°C, o módulo de armazenamento G' apresenta valores superiores ao do módulo G'' na amostra 35g/L, evidenciando o caráter sólido da mesma nestas temperaturas.

A adição de NaCl a 0,2M (Figura 42) leva a uma diminuição nos valores de ambos os módulos em relação à amostra solubilizada apenas em água. Os valores de G'' são superiores aos de G' até cerca de 65°C, onde ocorre uma inversão e a predominância do caráter sólido da solução. Após aproximadamente 85°C – 90°C a amostra amolece e ocorre uma queda acentuada nos valores de ambos os módulos, devido à grande redução na viscosidade da solução provocada pelo calor. Após o resfriamento não ocorre recuperação dos valores originais do módulo elástico G' e este retorna aos valores iniciais do módulo viscoso G'' apenas abaixo de 20° C.

A adição de 50% de sacarose (Figura 43) à amostra solubilizada em água levou a uma redução progressiva em ambos os módulos, que não têm seus valores recuperados após o resfriamento.

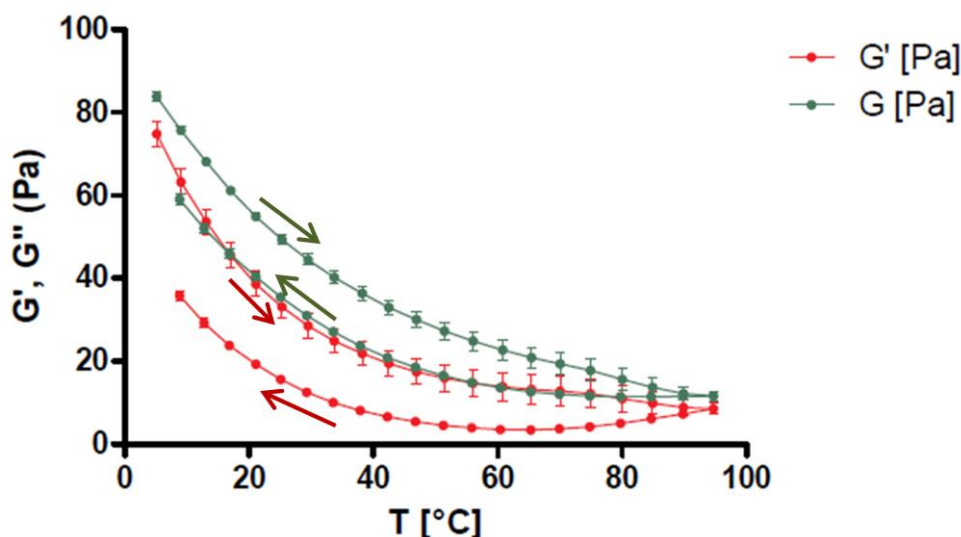


FIGURA 43 - VARIAÇÃO NOS MÓDULOS G' E G'' DA AMOSTRA 35G/L ADICIONADA DE 50% DE SACAROSE DURANTE AQUECIMENTO DE 5°C A 95°C E POSTERIOR RESFRIAMENTO DE 95°C A 5°C

A dependência dos módulos em relação à temperatura revela a instabilidade da solução, que se pronuncia em toda a faixa estudada. Esta está diretamente

relacionada às ligações cruzadas e aos efeitos opostos da temperatura nas interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio que as estabilizam. Com o aumento da temperatura as pontes de hidrogênio são enfraquecidas e as interações hidrofóbicas são fortalecidas. Em baixas temperaturas, as pontes de hidrogênio são favorecidas, reforçando as zonas de junção e elevação do módulo de armazenamento. Embora a formação de pontes de hidrogênio contribua mais do que duas vezes para as zonas de junção do que as interações hidrofóbicas, sozinhas não são suficientes para estabilizá-las (ALONSO-MOUGÁN *et al.*, 2002). Os dois efeitos opostos podem explicar o comportamento apresentado por todas as soluções com a mudança na temperatura

5 CONCLUSÕES

A partir do exocarpo, mesocarpo externo e pericarpo das variações clara e escura de frutos de Pequi (*Caryocar brasiliense*), foram obtidos extratos aquosos ricos em polissacarídeos que foram caracterizados utilizando métodos químicos e espectroscópicos como pectinas.

-No que concerne as análises químicas, os extratos das diferentes partes do fruto bem como das variedades de cor não apresentaram diferenças significativas entre si.

- A composição monossacarídica dos extratos revelou grande quantidade de ácidos urônicos, arabinose, galactose, glucose e traços de ramnose e xilose. O processo de carboxi-redução revelou que o ácido galacturônico é o ácido urônico presente, o que confirma a presença de pectinas nos extratos.

- Após sucessivas diálises, o teor de açúcares neutros foi reduzido e, conseqüentemente, a concentração de ácidos galacturônicos aumentou, revelando, conseqüentemente, uma concentração no teor de homogalacturonanas.

- As análises espectroscópicas (RMN) permitiram concluir que a cadeia principal das pectinas isoladas da casca do Pequi é constituída por unidades de α -D-GalpA-(1 \rightarrow 4)-ligadas, e os extratos a quente também revelaram a presença de unidades de β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-ligadas, provavelmente, como cadeias laterais da homogalacturonana.

- Com exceção das frações EEq, MCq E MEq, todas apresentaram alto grau de metoxilação (próximo a 100%), o que pode indicar que o processo de extração a quente extraia pectinas menos esterificadas, ou que este processo libere uma parte dos grupos metil-éster das unidades de ácido galacturônico.

- As análises reológicas das soluções formadas pela fração nativa R, extraída do pericarpo escuro e adicionada ou não de NaCl e sacarose demonstraram um comportamento tipicamente pseudoplástico, positivamente afetado pelo aumento da concentração de polissacarídeo e sacarose e pouco influenciado pela adição de NaCl. Estas frações não formaram géis, mas sim soluções concentradas, onde G' foi menor que G'' em todas as análises oscilatórias dinâmicas. A viscosidade e o caráter

viscoelástico aumentaram com o aumento da concentração de pectinas e sacarose, embora mesmo sob concentração elevada não apresentaram termoestabilidade.

Considerando tanto o rendimento quanto a estrutura química dos polissacarídeos isolados da casca do Pequi, bem como suas propriedades reológicas, podemos concluir que esta porção do fruto, outrora descartada, pode ser utilizada como fonte de pectinas para a indústria alimentícia. Neste setor, pode ser utilizada como agente espessante, principalmente, e ser uma alternativa de aproveitamento da biomassa residual do fruto de Pequi.

REFERÊNCIAS

ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE II (APG II), 2009.

ALONSO-MOUGÁN, M.; MEIJIDE, F.; JOVER, A.; RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, E.; VÁZQUEZ-TATO, J. Rheological behaviour of an amide pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 123-129, 2002.

ARAÚJO, F. D. de. A review of caryocar brasiliense (caryocaraceae) – an economically valuable species of the central brazilian cerrados. *Economic Botany*, New York, v. 49, n. 1, p. 40-48, 1995.

ASPINALL, G. O. Polysaccharides. Great Britain: Pergamon Press. 1970. 1ª Ed.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 1-25.

BÉDOUET, L.; COURTOIS, B.; COURTOIS, J. Rapid quantification of O-acetyl and O-methyl residues in pectin extracts. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 379-383, 2003.

BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; RIBEIRO C.; MIRANDA, C.; MAIA, J. M. TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Characterization of galactomannans extracted from seeds of *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica* through shear and extensional rheology: Comparison with guar gum and locust bean gum. **Food Hydrocolloids**, n. 24, p. 184 – 192, 2010.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, San Diego, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de Fatores Estruturais no Processo de Gelificação de Pectinas de Alto Grau de Metoxilação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 38 – 44, 1999.

CAMERON, R. G.; LUZIO, G. A.; GOODNER, K.; WILLIAMS, M. A. K. Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin methylesterase from

citrus: I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 287 – 299, 2008.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, USA, v. 3, n. 1, p. 1 – 30, 1993.

CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DE GOIÁS – CEASA/GO. Goiás: Secretaria de Agricultura, Pecuária e abastecimento o Estado de Goiás. Disponível em: <http://www.ceasa.goias.gov.br/ArquivosSiteCeasa/Conjunturas/analise2009/analise2009.pdf>. Acesso em: 10/06/2010.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; BERTOLINI, M. L C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**, v. 115, p. 687–690, 2009.

CROSS, M. M. Rheology of non-newtonian fluids: a new flow equation for pseudoplastic systems. **Journal of Colloid Science**, n. 20, p. 417 – 437, 1965.

DE VRIES, J. A.; ROMBOUTS, F. M.; VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W. Enzymic degradation of Apple pectins. *Carbohydrate Polymers*, v. 2, n. 1, p. 25 – 33, 1982.

DE VRIES, J. A. Repeating units in the structure of pectin. In: PHILIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. (Eds.). **Gums and stabilisers from the food industry**. Oxford: IRL Press, 1988, v. 4, p. 25-29.

DUBOIS, M.; GILLES, J. K. REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350 – 356, 1956.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – (EMBRAPA). **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, 2010.

EVAGELIOU, V.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. Effect of pH, sugar type and thermal annealing on high methoxyl pectin gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 245-259, 2000.

EVAGELIOU, V.; PTITCHIKINA, N. M.; MORRIS, E.R. Solution viscosity and structural modification of pumpkin biopectin. **Food Hydrocolloid**, v. 19, p. 1032 – 1036, 2005.

FERREIRA, F.R.; BIANCO, S.; DURIGAN, J. F.; BELINGIERI, P.A. Caracterização física e química de frutos maduros de pequi. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 9, 1987, Campinas. Anais...Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. v. 2, p. 643-646. Resumo.

FERREIRA, A.L., H.B.D., CURCIO & M. CALIARI. Estudo da presença de pectina no mesocarpo de pequi (*Caryocar brasiliense*) e sua capacidade na fabricação de geléias. p. 74. In. Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 14, 2005. Goiânia, Goiás. 424 p. Resumos.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of Uronic Acids without Interference from Neutral Sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FOOD AND AGRICULTURE ADMINISTRATIONS (FAO); WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Proposal for a definition and methods of analysis for dietary fibre content. **Codex Alimentarius Comission**, 2004.

FRAEYE, I.; DOUNGLA, E.; DUVETTER, T.; MOLDENAERS, P.; LOEY, A. V.; HENDRICKX, M. Influence of intrinsic and extrinsic factors on rheology of pectin–calcium gels. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2069 – 2077, 2009.

FUNAMI, T.; NAKAUMA, M.; ISHIHARA, S.; TANAKA, R.;INOUE, T.; PHILLIPS, G. O. Structural Modifications of Sugar Beet Pectin and the Relationship of Structure to Functionality. **Food Hydrocolloids** (2009), doi:10.1016/j.foodhyd.2009.11.017.

GLICKSMAN, M. **Food Hydrocolloids**. Florida: CRS Press, 1984, v. III, p. 205-229.

HAMINIUK, C. W. I.; SIERAKOWSKI, M. R.; IZIDORO, D. R.; MACIEL, G. M.; SCHEER, A. de P.; MASSON, M. L. Comportamento reológico de sistemas pécticos de polpas de frutas vermelhas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 225 – 231, 2009.

HERINGER, E. P. Relatório das pesquisas dos cerrados de minas gerais pelo agri-avicultor Ezequias Paulo Heringer, ate 1º. de novembro de 1960. Mimeog. 1960.

HERZOG-SOARES, J. D'ARC; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERRA, J.C.B.; GOMES, M.H.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Rev. Brás. Farmacogn.** V. 12, supl., p. 01-02, 2002.

HOKPUTSA, S.; HARDING, S. E.; INNGJERDINGEN, K.; JUMEL, K.; MICHAELSEN, T. E.; HEINZE, T.; KOSCHELLA, A.; PAULSEN, B. S. Bioactive polysaccharides from the stems of the Thai medicinal plant *Acanthus ebracteatus*: their chemical and physical features. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 4, p. 753 – 762, 2004.

HOUBEN, K.; JOLIE, R. P.; FRAEYE, I.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 1105-1111, 2011.

HOUSKA, M.; VALENTOVA, H.; NOVOTNA, P.; STROHALM, J.; SESTAK, J.; POKORNY, J. Shear rates during oral and nonoral perception of viscosity of fluid foods. **Journal of Texture Studies**, v. 29, p. 603 – 615, 1998.

HOWLETT, J. F.; BETTERIDGE, V. A.; CHAMP, M.; CRAIG, S. A. S.; JONES, J. M. The definition of dietary fiber – discussions at the Ninth Vahouny Fiber Symposium: building scientific agreement. **Food & Nutrition Research**, v. 54, 2010.

IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Structural and rheological properties of polyssacharides from mando (*Mangifera indica* L.) pulp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 9 – 17, 2002.

JANSON, P. –E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LONNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chemical Communications**, Estocolmo, v. 8, p. 1-71, 1976.

KEENAN, M. H. J.; BELTON, P. S.; MATTHEW, J. A.; HOWSON, S. J. A ¹³C NMR study of sugar beet pectin. **Carbohydrate Research**, v. 138, p. 168 – 170, 1985.

KIM, Y.; TENG, Q.; WICKER, L. Action pattern of *Valencia orange* PME deesterification of high methoxyl pectin and characterization of modified pectins. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2620-2629, 2005.

KOUBALA, B. B.; MBOME, L. I.; KANSCI, G.; MBIAPO, F. T.; CREPEAU, M. J.; THIBAUT, J. F.; RALET, M. C. Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1202 – 1207, 2008.

LEHNINGER, A. L. & NELSON, D. L. & COX, M. M. - Princípios de Bioquímica. São Paulo, Sarvier, 2006.

LIMA, A. de; SILVA, A. M. de O. e, TRINDADE, R. A., TORRES, R. P., MANCINI-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, v.29, n. 3, p. 695 – 698, 2007.

LUZIO, G.A; CAMERON, R. G. Demethylation of a model homogalacturonan with the salt-independent pectin methyltransferase from citrus: Part II. Structure–function analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 300 – 309, 2008.

MALKIN, Y. A. **Rheology Fundamentals**. Toronto: ChemTec, 1994.

MARCONDES-NOGUEIRA, A.P.; ALVES, S.M; MARSON-ASCENCIO, P.G.; SILVA, E.R.; ASCENCIO, S. D. Caracterização parcial dos polissacarídeos e ensaios de inibição enzimática do extrato aquoso de *Caryocar brasiliense* In.: V Congresso Científico e VII Jornada de Iniciação Científica do CEULP/ULBRA, 2007.

MARCOTTE, M.; HOSHAHLI, A. R. T.; RAMASWAMY, H. S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International**, v. 34, n. 8, p. 695 – 703, 2001.

MAY, C. D. Industrial Pectins: sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 79-99.

McCANN, M. C.; ROBERTS, K. Plant cell wall architecture: the role of pectins. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.). Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases. Amsterdam: Elsevier, 1996, p. 91 - 107.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426 – 428, 1959.

MONGE, M. E.; NEGRI, R. M.; KOLENDER, A. A.; ERRA-BALSELLS, R. Structural characterization of native high-methoxylated pectin using nuclear magnetic resonance spectroscopy and ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Comparative use of 2,5-dihydroxybenzoic acid and nor-harmane as UV-MALDI matrices. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 2638 – 2646, 2007.

MORRIS, E. R. Polysaccharide Rheology and In-Mouth Perception. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 517-546.

MUKHIDDINOV, Z. K. et al. Isolation and structural characterization of pectin homo and rhamnogalacturonan. *Talanta*, v. 53, p. 171-176, 2000.

MULLINEUX, G. Non-linear least squares fitting of coefficients in the Herschel–Bulkley model. **Applied Mathematical Modelling**, v. 32, n. 12, p. 2538 – 2552, 2008.

NAÉ, H. N. Introduction of rheology. In: LABA, D. (Ed.) **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 9.

NORZIAH, M. H.; KONG, S. S.; ABD KARIM, A.; SEOW, C. C. Pectin – sucrose – Ca^{2+} interactions: effects on rheological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 491 – 498, 2001.

OLIVEIRA, L. dos S.; PALUDO, A.; FRANÇA, L. V. de; VILELA, M. de F.; DUBOC, E. Distribuição Geográfica de Espécies Nativas do Cerrado: Resultados Preliminares. In. Simpósio Nacional Cerrado, IX, 2008, Brasília, DF.

OSMAN, E. M. Interaction of starch with other components of food systems. **Food Technology**, v. 29, n. 4, p. 30 – 35, 1975.

PÉREZ, S; MAZEAU, K.; du PENHOAT, C. H. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 37-55, 2000.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. (7ª Ed.). Rio de Janeiro: Guanabara, p. 58 – 63, 2007.

REID, J. S. G. Carbohydrate Metabolism: Structural Carbohydrates. **Plant Biochemistry**, p. 205-236, 1997.

RIBEIRO, R. F. Pequi: o rei do cerrado. Belo Horizonte: Rede Cerrado, 2000. 62p.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, USA, v. 57, p. 929 – 967, 2001.

RODRIGUEZ-CARVAJAL, M. A. *et al.* The three-dimensional structure of the megaoligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer: A combined molecular modeling and NMR investigation. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 651-671, 2003.

ROLIN, C. Pectins. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. **Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives**. 3 ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 257-293.

ROSENBOHM, C.; LUNDT, I.; M.I.E., T.; YOUNG, N. W. G. Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by ¹H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 7, p. 637 – 649, 2003.

SANTOS, M. da S.; PETKOWICZ, C. L. O.; HAMINIUK, C. W. I.; CANDIDO, L. M. B. Estudo das propriedades químicas e reológicas dos polissacarídeos extraídos da Gabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg). **Revista Iberoamericana de Polimeros**, v. 11, n. 6, p. 359 – 373, 2010.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**. v. 340, p. 731-739, 2005.

SCHOTT, H. Reologia. In : GENNARO, A. R. **Remington: Farmácia**, Buenos Aires: Ed. Med. Panamericana, v.2, p. 461, 1992.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. Tradução e adaptação: Cheila Mothé *et al.* São Paulo: Artliber, 2006.

SENGKHAMPARN, N.; SAGIS, L. M. C.; VRIES, R. DE; SCHOLS, H. A.; SAJJAANANTAKUL, T.; VORAGEN, A. G. J. Physicochemical properties of pectins from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 35 – 41, 2010.

SHARMA, S. K.; LIPTAYB, A.; Le MAGNERC, M. Molecular characterization, physico-chemical and functional properties of tomato fruit pectin. **Food Research International**, v. 30, n. 1, p. 543 – 547, 1998.

SINGTHONG, J.; NINGSANOND, S.; CUI, S. W.; GOFF, H. D. Extraction and physicochemical characterization of Krueo Ma Noy pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 793 – 801, 2005.

SINKO, P. J. **Martin – Físico Farmácia e Ciências Farmacêuticas**. (5ª Ed.). Artmed, p. 577 – 597, 2008.

SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydrate Chemistry**. v. 6. p. 20-24, 1972.

SOARES JUNIOR, M. S.; BASSINELLO, P. Z.; CALIARI, M.; REIS, R. C. dos; LACERDA, D. C. L.; KOAKUZU, S. N. Development and chemical characterization of flour obtained from the external mesocarpo of “pequizeiro” fruit. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas - SP, 2010.

SOUSA, W. A.; SOUSA, K. S.; MARSON-ASCENCIO, P. G.; ASCENCIO, S. D. Resultados parciais do estudo fitoquímico e da análise dos polissacarídeos de *Caryocar brasiliense* camb. (caryocaraceae). In.: IV Congresso Científico do CEULP/ULBRA, 2005.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. 2. ed. Michigan: Freeman, 1996.

STONE, B. A.; ANDERSON, M. A. A radiochemical approach to the determination of carboxylic acid groups in polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 5, p. 115 - 129, 1985.

SYBIE NEIDHART, S.; HANNAK, C.; GIER SCHNER, K. Investigations of the Influence of various cations on the rheological properties of high-esterified pectin gels. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Ed.). **Pectins and Pectinases**. Elsevier Science B.V. 1996, p. 583 – 590.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Paredes Celulares: Estrutura, Biogênese e Expansão. **Fisiologia Vegetal**. (4ª ed.) Porto Alegre: Artmed, p. 407 – 433, 2009.

TAMAKI, Y.; KONISHI, T.; FUKUTA, M.; TAKO, M. Isolation and structural characterisation os pectin from endocarpo f *Citrus depressa*. **Food Chemistry**, v. 107, p. 352 – 361, 2008.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric Depolymerization of Polyuronides and Glycosaminoglycuronans to Monosaccharides Following Reduction od Their Carbodiimide – Activated Carboxyl Groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383 – 1389, 1972.

TONELI, J. T. de C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n. 2, p. 181 – 204, 2005.

TOWLE, G. A.; CHRISTENSEN, O. Pectin. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. (Eds.) **Industrial Gums**. London: Academic Press, 1973, p. 429 – 459.

VERA, R.; SOUZA, E. R. B. de; FERNANDES, E. P.; NAVES, R. V.; SOARES, M. Jr.; CALIARI, M.; XIMENES, P. A. Caracterização Física e Química de Frutos do Pequiizeiro (*Caryocr brasiliense* Camb.) oriundos de duas regiões no Estado de Goiás, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.2, n.37, p. 93-99, 2007.

VORAGEN, A. G. J. *et. al.* Pectins. In: STEPHEN, A. M. (Ed.). **Food polyssaccharides and their aplications**. New York: Marcel Dekker, 1995, p. 287 – 340.

VRIESMANN, L. C.; PETCKOWICZ, C. L. Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 72-79, 2009.

VRIESMANN, L. C.; SILVEIRA, J. L. M.; PETCKOWICZ, C. L. Rheological behavior of a pectic fraction from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 312 – 317, 2010a.

VRIESMANN, L. C.; SILVEIRA, J. L. M.; PETCKOWICZ, C. L. Chemical and rheological properties of a starch-rich fraction from the pulp of the fruit cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 651 – 656, 2010b.

VRIESMANN, L. C.; AMBONI, R. D. de M.; PETKOWICZ, C. L. de O. Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L): composition and hot-water-soluble pectins. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1173-1181, 2011.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97-104, 2006.